

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉVALUATION DES PROPRIÉTÉS ANTI-INFLAMMATOIRES ET
IMMUNOSTIMULANTES DE PRODUITS DE FERMENTATION DE LACTOSÉRUM
PAR *L. KEFIRANOFACIENS* R2C2

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
PATRICE CHARBONNEAU LAROSE

JANVIER 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance au Dr. Lucie Lamontagne, ma directrice de recherche, d'une part, pour la confiance qu'elle m'a accordée dès mon arrivée dans le laboratoire, mais également pour ses multiples conseils, pour sa grande disponibilité, pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger cette recherche, pour son engouement face à la science qu'elle m'a transmis, pour son support, ainsi que pour sa rigueur scientifique qui m'ont servi d'inspiration au cours de ma maîtrise.

Je remercie particulièrement M. Christian Bleau, assistant de recherche du Dr Lamontagne, pour son aide et ses conseils judicieux, ainsi qu'Isabelle Poirier, Mathieu Cambos, Vinicio Vasquez, Stéphanie Bazinet, Alexandre Jacques, Dr. Tatiana Scorza et tous mes collègues de laboratoire pour leur bonne compagnie et leurs conseils.

Toute notre équipe de recherche tient aussi à remercier le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation ainsi que la compagnie les Technologies BiolActis Inc. pour leur soutien financier sans lequel ce projet n'aurait pas pu se concrétiser. Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans le support de l'équipe de R & D des Technologies BiolActis, particulièrement, les Drs. Josée Beaulieu, Éric Trottier, Pierre Lemieux, Éric Simard, ainsi que leur personnel technique.

Également, je remercie profondément Raymond, France, Georges, Astrid, ainsi que tous les autres membres de ma famille et mes amis qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de mes études.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
RÉSUMÉ.....	xiv
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 L'intestin: anatomie, fonctions et immunité.....	1
1.1.1 L'intestin grêle.....	1
1.1.2 Le côlon.....	3
1.1.3 Caractéristiques et fonctions de la barrière intestinale.....	4
1.1.4 Le système immunitaire intestinal.....	5
1.1.5 La réponse immune intestinale.....	5
1.1.6 Les populations lymphoïdes intestinales.....	9
1.1.7 La tolérance immunologique intestinale.....	15
1.2 Rôle de la flore microbienne dans la régulation de l'état immunitaire de l'intestin...16	16
1.2.1 La barrière intestinale.....	16
1.2.2 Espèces bactériennes de la microflore intestinale.....	17
1.3 Les maladies inflammatoires intestinales humaines (MII).....	18
1.3.1 La maladie de Crohn et la colite ulcérate.....	18
1.3.2 Les lésions intestinales de la maladie de Crohn et de la colite ulcérate.....	18
1.3.3 Anomalies immunitaires associées aux maladies inflammatoires intestinales.....	20
1.3.4 Les facteurs génétiques impliqués dans les MII chez l'humain.....	21
1.4 Implication majeure des macrophages.....	22
1.4.1 Activation des TLRs chez les macrophages.....	22
1.5 Cytokines et molécules impliquées dans l'inflammation intestinale.....	24
1.5.1 L'interleukine-1.....	24
1.5.2 L'interleukine-6.....	25

1.5.3	L'interleukine-8.....	25
1.5.4	L'interleukine-10.....	26
1.5.5	Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α).....	27
1.5.6	La prostaglandine E2.....	27
1.5.7	L'interleukine-17.....	28
1.5.8	L'interleukine-23.....	29
1.6	Modèles animaux de maladies inflammatoires intestinales.....	32
1.6.1	Les modèles animaux de colite inflammatoire.....	32
1.6.2	Les modèles de colite induite par le DSS et le TNBS.....	33
1.6.3	Le modèle de la souris knock-out IL-10.....	36
1.7	Les lactobacilles et l'immunité.....	37
1.7.1	Les probiotiques.....	37
1.7.2	Caractéristiques des lactobacilles.....	38
1.7.3	Utilisation des lactobacilles dans l'industrie alimentaire.....	39
1.7.4	Effets immunomodulateurs induits par des lactobacilles.....	40
1.7.5	Rôles des lactobacilles dans les fonctions immunitaires intestinales.....	40
1.8	Propriétés de <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	42
1.8.1	Caractéristiques de <i>L. kefiranofaciens</i>	42
1.8.2	Propriétés immunologiques des composantes de <i>L. kefiranofaciens</i>	43
1.8.3	Effets de <i>L. kefiranofaciens</i> sur l'immunité intestinale.....	44
1.9	Produits BiolActis et lactosérum.....	45
1.9.1	Observations sur les propriétés immunomodulatrices des produits BiolActis.....	45
1.9.2	Substances immunomodulatrices du lactosérum.....	48
1.10	Hypothèses et objectifs de la recherche.....	52

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	55
2.1 Animaux.....	55
2.2 Cellules.....	55
2.2.1 Les cellules épithéliales intestinales humaines.....	55

2.2.2	Culture primaire de splénocytes de souris C57BL/6.....	56
2.2.3	Culture primaire de macrophages spléniques de souris C57BL/6.....	56
2.3	Préparation des produits BiolActis.....	57
2.3.1	Préparation de la souche bactérienne et pasteurisation.....	57
2.3.2	Préparation des extraits solubles des MPMs de BiolActis.....	57
2.4	Étude des propriétés immunomodulatrices des extraits solubles des MPMs.....	58
2.4.1	Effet des produits BiolActis sur les cellules Caco-2 activées avec l'IL-1 β	58
2.4.2	Effet des produits BiolActis sur les macrophages activés par le peptidoglycane (PEP), en présence/absence d'inhibiteurs de récepteur membranaire ou de voies de signalisation.....	58
2.5	Expériences <i>in vivo</i> dans un modèle de colite expérimentale induite par le sulfate de dextran sodium (DSS).....	59
2.5.1	Induction de la colite par le DSS.....	59
2.5.2	Étude <i>in vivo</i> de l'administration simultanée de MPM de BiolActis lors de l'induction et pendant la colite expérimentale.....	60
2.5.3	Étude <i>in vivo</i> d'administration préventive des produits BiolActis avant l'induction et pendant la colite expérimentale.....	60
2.6	Mesure de la cytotoxicité cellulaire induite par les produits BiolActis sur les cellules en culture.....	61
2.7	Dosage de cytokines par ELISA.....	62
2.8	Prélèvement, isolement et purification des lymphocytes intraépithéliaux, de la lamina propria et des plaques de Peyer de l'intestin grêle.....	62
2.9	Immuno-marquages des cellules intestinales pour analyse par cytofluorométrie.....	65
2.10	Analyse de l'expression de l'IL-23 et de l'IL-17A par une technique de RT-PCR semi-quantitatif.....	66
2.11	Données et analyses statistiques.....	67

CHAPITRE III

RÉSULTATS.....	69
3.1 Effets des produits de fermentation du lactosérum par la souche <i>L.kefiranofaciens</i> de BiolActis sur les cellules épithéliales intestinales.....	69

3.1.1	Apoptose et nécrose des cellules épithéliales intestinales.....	69
3.1.2	Production d'IL-8 par les cellules épithéliales Caco-2.....	70
3.2	Effets des produits de fermentation du lactosérum par la souche <i>L. kefiranofaciens</i> de BiolActis sur les cellules mononucléaires de la rate (splénocytes) et les macrophages de souris C57BL/6.....	70
3.2.1	Apoptose et nécrose des splénocytes.....	70
3.2.2	Effets des produits de BiolActis sur la production de cytokines par les macrophages spléniques.....	71
3.2.3	Effets des produits de BiolActis sur la production d'IL-6 par les macrophages spléniques.....	72
3.2.4	Effets des produits de BiolActis sur la production d'IL-10 par les macrophages spléniques.....	74
3.2.5	Effets des produits de BiolActis sur la production de PGE2 par les macrophages spléniques.....	74
3.2.6	Effets immunomodulateurs de la préparation soluble de la bactérie <i>L. kefiranofaciens</i> R2C2.....	75
3.2.7	Résumé des effets immunomodulateurs des produits BiolActis.....	75
3.3	Propriétés immunomodulatrices des MPMs administrés simultanément chez des animaux dans un modèle de colite expérimentale induite par le DSS.....	76
3.3.1	Évolution du poids et des signes cliniques des animaux.....	76
3.3.2	Effets des MPMs sur l'inflammation intestinale induite par le DSS.....	77
3.3.3	Effets des MPMs sur les différentes populations lymphocytaires des tissus lymphoïdes intestinaux lors d'inflammation intestinale induite par le DSS.....	78
3.4	Propriétés immunomodulatrices des MPMs et de la bactérie <i>L. kefiranofaciens</i> R2C2 administrés préventivement chez des animaux dans un modèle de colite expérimentale induite par le DSS.....	80
3.4.1	Évolution du poids et des signes cliniques chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou la bactérie R2C2 dans le modèle de colite intestinale induite par le DSS.....	80
3.4.2	Effets sur le niveau d'inflammation et sur la production de cytokines	

de l'administration préventive de MPM ou de la bactérie R2C2 dans le modèle de colite intestinale induite par le DSS.....	81
3.4.3 Effets de l'administration préventive des MPMs et de la bactérie R2C2 sur les différentes populations lymphocytaires des tissus lymphoïdes intestinaux lors d'inflammation intestinale induite par le DSS..	82
3.4.4 Les populations lymphocytaires des plaques de Peyer.....	82
3.4.5 Les populations lymphocytaires intraépithéliales.....	83
3.4.6 Les populations lymphocytaires de la lamina propria.....	84
3.4.7 Effet de l'administration préventive des MPMs et de la bactérie R2C2 sur la production d'IL-23 et d'IL-17 lors d'inflammation intestinale induite par le DSS.....	85
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	117
CONCLUSION.....	131
BIBLIOGRAPHIE.....	134

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Éléments lymphoïdes de l'intestin associés au système lymphatique.....6
1.2	Modèle de différenciation des lymphocytes dans le tissu intestinal.....31
1.3	Analyse histologique de côlon de souris en inflammation.....35
3.1	Cytotoxicité des produits BiolActis sur les cellules Caco-2.....87
3.2	Cytotoxicité de <i>L. kefiranofaciens</i> R2C2 sur les cellules Caco-2.....88
3.3	Effet des produits BiolActis sur la production d'IL-8 par les cellules Caco-2 stimulées avec de l'IL-1 β89
3.4	Cytotoxicité des produits BiolActis sur les splénocytes de souris C57BL/6.....90
3.5	Cytotoxicité de <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> R2C2 sur les splénocytes de souris C57BL/6.....91
3.6	Modifications dans la production d'IL-6 par les macrophages de souris C57BL/6 traités par le peptidoglycane et différents produits BiolActis, en présence ou en absence d'inhibiteurs spécifiques.....92
3.7	Modifications dans la production d'IL-10 par les macrophages de souris C57BL/6 traités par le peptidoglycane et différents produits BiolActis, en présence ou en absence d'inhibiteurs spécifiques.....93
3.8	Modifications dans la production de PGE2 par les macrophages de souris C57BL/6 traités par le peptidoglycane et différents produits BiolActis, en présence ou en absence d'inhibiteurs spécifiques.....94
3.9	Modifications dans la production d'IL-6 et d'IL-10 par les macrophages de souris C57BL/6 traités avec la bactérie <i>L. kefiranofaciens</i> R2C2 en présence/absence d'inhibiteurs spécifiques.....95
3.10	Évolution du poids des souris traitées avec des MPMs pendant l'induction de la colite par le DSS.....96
3.11	Évolution de l'hématocrite chez des souris traitées avec du MPM pendant l'induction d'une colite par le DSS.....97

3.12	Évolution du poids relatif du côlon par centimètre et poids relatif du côlon par gramme de poids de l'animal chez des souris traitées avec du MPM pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	98
3.13	Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et de PGE2 chez des souris traitées avec du MPM pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	99
3.14	Pourcentages de cellules CD4+, CD8+ et CD19+ dans les plaques de Peyer chez des souris traitées avec du MPM pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	100
3.15	Pourcentages de cellules intraépithéliales CD4+, CD8+ et TCR $\gamma\delta$ +, FoxP3+, CD4+ et CD8+, CD4+CD8+ et CD8+ TCR $\gamma\delta$ +, NK1.1+ et CD19+ chez des souris traitées avec du MPM pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	101
3.16	Pourcentages de cellules CD4+, CD8+ et TCR $\gamma\delta$ +, FoxP3+, CD4+ et CD8+, CD4+CD8+ et CD8+ TCR $\gamma\delta$ +, NK1.1+ et CD19+ de la lamina propria chez des souris traitées avec du MPM pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	102
3.17	Évolution du poids chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	103
3.18	Évolution de l'hématocrite chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	104
3.19	Évolution du poids relatif du côlon par centimètre chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	105
3.20	Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et de PGE2 chez des souris traitées avec du MPM ou R2C2 avant l'induction d'une colite par le DSS.....	106
3.21	Pourcentages de cellules CD4+, CD8+ et CD4+CD8+ dans les plaques de Peyer chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	107
3.22	Pourcentages de cellules CD19+, NK1.1+ et CD19+NK1.1+ dans les plaques de Peyer chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	108

3.23	Pourcentages de cellules CD4+IL17+, TCR $\gamma\delta$ +, CD4+TCR $\gamma\delta$ + et CD8+TCR $\gamma\delta$ +, dans les plaques de Peyer chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	109
3.24	Pourcentages de cellules intraépithéliales CD4+, CD8+ et CD4+CD8+ de l'intestin grêle chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	110
3.25	Pourcentages de cellules intraépithéliales CD19+, NK1.1+ et CD19+NK1.1+ de l'intestin grêle chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	111
3.26	Pourcentages de cellules intraépithéliales CD4+IL17+, FoxP3+, CD4+FoxP3+, CD8+FoxP3+ et TCR $\gamma\delta$ +, CD4+TCR $\gamma\delta$ +, CD8+ TCR $\gamma\delta$ + de l'intestin grêle chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	112
3.27	Pourcentages de cellules CD4+, CD8+ et CD4+CD8+ de la lamina propria de l'intestin grêle chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	113
3.28	Pourcentages de cellules CD19+, NK1.1+ et CD19+NK1.1+ de la lamina propria de l'intestin grêle chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	114
3.29	Pourcentages de cellules CD4+IL17+, FoxP3+, CD4+FoxP3+, CD8+FoxP3+ et TCR $\gamma\delta$ +, CD4+TCR $\gamma\delta$ + et CD8+ TCR $\gamma\delta$ + de la lamina propria de l'intestin grêle chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	115
3.30	Niveaux relatifs d'IL-17 et d'IL-23 exprimés dans les côlons de souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS.....	116

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN copie
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
CD	Cluster de différenciation
COX-2	Cyclo-oxygénase II
DSS	Sulfate de dextran sodium
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
EPS	Exopolysaccharides
ERK	Kinase régulée par les signaux extracellulaires
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
Foxp3	Forkhead box p3
GALT	Gut associated lymphoid tissue / Tissu lymphoïde associé à l'intestin
GMP	Glycomacropeptide
HBSS	Solution saline balancée Hanks
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyle)-1-pipérazine éthane sulfonique
HEV	High endothelial venules / Veinules endothéliales hautes
iCOX2	Inhibiteur de la COX-2
iERK	Inhibiteur de ERK
IEC	Cellule épithéliale intestinale
IEL	Lymphocyte intraépithélial
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
iNfκB	Inhibiteur de Nf-κB
iP38	Inhibiteur de p38
iRO	Inhibiteur des récepteurs opioïdes
LAB	Bactérie acide lactique
LK	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>

LP	Lamina propria
LPL	Lymphocyte de la lamina propria
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
MII	Maladies intestinales inflammatoires
MPM	Matrice de protéines malléable ou MultiPlex matrice
MPO	Myeloperoxidase
Nf-κB	Facteur de transcription nucléaire kappa-B
NK	Natural killer / Cellule tueuse naturelle
NO	Oxyde nitrique
NOD2	Domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides
PAMP	Patterns moléculaires associées aux pathogènes
PBS	Solution saline phosphate tamponnée
PCR	Réactions en chaîne par la polymérase
PE	Phycoérythrine
PEP	Peptidoglycane
PerCP	Protéine chlorophylle péricidine
PG	Prostaglandine
PGE2	Prostaglandine E2
PHA	Phytohémagglutinine
PP	Plaqué de Peyer
PPL	Lymphocyte des plaques de Peyer
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPMI	Milieu de culture Roswell Park Memorial Institute
RT	Transcription inverse ou rétro-transcription
SVF	Sérum de veau fœtal
TCR	Récepteur des cellules T
TGF	Tumor growth factor / Facteur de croissance tumorale
Th	Lymphocyte/réponse T helper
Th1	Lymphocyte/réponse T helper de type 1
Th2	Lymphocyte/réponse T helper de type 2

Th17	Lymphocyte/réponse T helper associé à la voie de l'IL-17
TLR	Récepteur Toll-like
TNBS	Acide trinitrobenzène sulfonique
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha / Facteur de nécrose tumorale alpha
Treg	Lymphocyte T régulateur

RÉSUMÉ

Les objectifs de ce projet étaient d'identifier les propriétés immunomodulatrices de produits obtenus par la fermentation du lactosérum à l'aide de souches sélectionnées de *Lactobacillus kefiranofaciens* développées par la compagnie Technologies BiolActis Inc. Différentes préparations d'une matrice protéique malléable (MPM), contenant des substances solubles et des bactéries ont été générées par fermentation et leurs effets sur les macrophages et les cellules épithéliales intestinales ont été évalués *in vitro* par analyse de la production de cytokines inflammatoires ainsi que l'étude des voies de signalisation intracellulaire impliquées. Nous avons aussi vérifié l'efficacité anti-inflammatoire *in vivo* des MPMs et de la souche bactérienne lors de colites expérimentales aiguës chez des animaux afin d'identifier les cytokines et cellules suppressives impliquées. Des groupes de souris ont été traitées simultanément ou de façon préventive avec des produits choisis afin d'en vérifier les effets anti-inflammatoires lors de l'induction de la colite expérimentale par le sulfate de dextran. De nombreux paramètres biologiques et immunologiques ont été évalués, tels que le poids, le taux d'hématocrite, la densité du côlon, les niveaux de production de cytokines par des tests ELISA ou par RT-PCR en temps réel ainsi que plusieurs immunomarquages des diverses populations lymphocytaires dans les tissus intestinaux analysés par cytofluorométrie. Les résultats obtenus *in vitro* indiquent que les produits de fermentation du lactosérum modulent la production de cytokines macrophagiques pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Certains produits de fermentation augmentent la production de l'IL-6 induite par le PEP ou diminuent la production de la PGE2 sans affecter significativement la production de l'IL-10. Ces produits exercent leurs effets surtout par l'activation des voies dépendant des MAPK p38 et ERK1/2 ainsi que de la COX-2. La souche bactérienne R2C2 induit aussi bien la production d'IL-6 que celle de l'IL-10 chez les macrophages. Tous les produits de fermentation ont diminué la production de la chimiokine IL-8 par les cellules épithéliales intestinales impliquées dans l'induction de la réponse inflammatoire. Lors de la colite expérimentale induite par le DSS, l'administration simultanée de MPM a corrigé la perte de poids des animaux et rétablit la perte de lymphocytes B dans les tissus épithéliaux. L'utilisation préventive du MPM et de la bactérie R2C2 a empêché l'anémie induite par le DSS mais a aggravé la perte de poids et l'inflammation du côlon malgré la production accrue d'IL-10 et la stimulation de lymphocytes T suppresseurs. Ces effets ont été accompagnés de l'activation d'une nouvelle classe de lymphocytes, les Th17. Les effets anti-inflammatoires semblent plus intéressants lors d'une utilisation simultanée, suggérant la prise de ces produits lors de troubles gastro-intestinaux légers. D'autre part, les modifications dans les conditions de production pourraient expliquer les différences observées dans l'efficacité anti-inflammatoire des produits.

Mots clés: Colite, DSS, Inflammation, Intestin, Lactobacilles, *Lactobacillus kefiranofaciens*, Lactosérum, IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, Macrophages, PGE-2, TNF- α .

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Les maladies inflammatoires intestinales prennent de plus en plus d'importance et leur contrôle nécessite une médication immunosuppressive qui peut entraîner des problèmes à long terme. La recherche de souches de lactobacilles pouvant moduler les déséquilibres inflammatoires de l'intestin est une avenue prometteuse tout en assurant une quasi-absence d'effets secondaires. La revue de littérature supportant la recherche effectuée dans le cadre de ce mémoire va mettre en lumière les structures intestinales ainsi que les mécanismes impliquées dans l'équilibre tolérance-réponse inflammatoire induit par la flore microbienne et les lactobacilles. Elle va aussi mettre un accent particulier sur les propriétés des bactéries dites 'probiotiques' dans le but d'introduire les matrices protéiques malléables dérivées de la fermentation du lactosérum par une souche de *Lactobacillus kefiranofaciens* produite par l'entreprise Les Technologies BiolActis Inc.

1.1 L'intestin: son anatomie et ses fonctions

L'intestin constitue la partie du tube digestif qui va de l'estomac à l'orifice anal. Il est généralement divisé en deux parties : l'intestin grêle ou petit intestin et le gros intestin, appelé également côlon. L'intestin grêle constitue le principal organe de la digestion. Il mesure environ 6 m et il est segmenté en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléum. Ces segments intestinaux ne possèdent pas tous la même structure au niveau de leur muqueuse (Gosling, 2003; Eckert *et al.*, 1999).

1.1.1 L'intestin grêle

Le duodénum est le seul segment fixe de l'intestin grêle, il permet la jonction entre l'estomac et l'intestin grêle. Sa membrane est plus épaisse et plus résistante à l'acidité (Gosling, 2003; Eckert *et al.*, 1999). Le jéjunum est situé entre le duodénum et l'iléum. Ce segment contient le plus d'enzymes digestives de toutes sortes au niveau de la membrane de

la bordure en brosse des microvillosités, la majeure partie de la digestion enzymatique s'y effectuent (Gray *et al.*, 1995). L'iléum est la troisième et plus longue partie de l'intestin grêle et la majorité de l'absorption des nutriments importants y a lieu (Gosling, 2003; Eckert *et al.*, 1999, Gray *et al.*, 1995).

Le rôle de l'intestin grêle est de terminer la digestion et d'absorber les nutriments. Les parois internes de l'intestin grêle sont couvertes de plis circulaires, de villosités intestinales et de microvillosités (Eckert *et al.*, 1999, Gray *et al.*, 1995). La muqueuse présente aussi des villosités intestinales plus petites. Au centre de chaque villosité nous retrouvons des capillaires sanguins et des capillaires lymphatiques appelés vaisseaux chylifères. Les nutriments vont pénétrer dans les vaisseaux sanguins et les vaisseaux chylifères. Les microvillosités sont de minuscules structures en forme de saillie, constituées par la membrane cytoplasmique des cellules épithéliales. Elles augmentent la surface d'absorption et possèdent plusieurs enzymes permettant la digestion des sucres et des protéines (Gosling, 2003; Gray *et al.*, 1995).

Les glandes de Lieberkühn, sont des glandes de forme tubulaire présentes à la surface de la muqueuse de l'intestin grêle. Elles sécrètent un suc intestinal constitué d'un mélange d'eau et de mucus. Il sert à solubiliser et à transporter les nutriments pour ainsi faciliter leur absorption. Au fond des cryptes, près des glandes de Lieberkühn, se trouvent les cellules de Paneth qui libèrent des lysozymes et une variété d'enzymes défensives. Ces enzymes protègent l'intestin grêle contre l'agression constante par les bactéries intestinales. La plupart des enzymes digestives produites au niveau de l'intestin restent accrochées aux cellules épithéliales de la membrane à bordure en brosse (Gosling, 2003; Eckert *et al.*, 1999, Gray *et al.*, 1995).

Le tissu intestinal est divisé en 4 couches, qui sont de l'intérieur vers l'extérieur : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse ou adventice. La couche de cellules épithéliales de la muqueuse est renouvelée environ tous les 5 jours. La couche muqueuse repose sur la muscularis mucosae, elle comprend l'épithélium et la lamina propria. Ce tissu contient des follicules lymphatiques individuels et des follicules lymphatiques agrégés qui

portent le nom de plaques de Peyer, ainsi que plusieurs vaisseaux et glandes. La couche musculieuse est divisée en couche musculieuse longitudinale externe, qui permet la progression du chyme, et en couche circulaire interne, qui permet d'augmenter la surface d'échange (Gosling, 2003; Eckert *et al.*, 1999, Gray *et al.*, 1995).

1.1.2 Le côlon

Le côlon, ou gros intestin, constitue la dernière partie de l'intestin et il sert essentiellement à absorber l'eau et les électrolytes. La flore bactérienne qui s'y trouve effectue la digestion finale qui résulte en l'obtention de selles et de gaz qui seront ensuite éliminés. Le côlon est divisé en quatre sections : le côlon droit (ascendant), le côlon transverse, le côlon gauche (descendant) et le côlon sigmoïde qui aboutit au rectum (Gosling, 2003; Eckert *et al.*, 1999, Gray *et al.*, 1995).

Le rôle du côlon est d'absorber l'eau et d'élaborer les matières fécales à partir des résidus alimentaires et des bactéries présentes dans le côlon. Contrairement à l'intestin grêle, la muqueuse intestinale colique ne comporte pas de villosités, mais uniquement des invaginations profondes appelées cryptes. La muqueuse du côlon est constituée d'un épithélium pavimenteux et les cryptes sont en majorité constituées de cellules caliciformes. Ces cellules sécrètent un mucus qui permet de maintenir la muqueuse lubrifiée afin que les selles puissent bien glisser vers le rectum. En plus des cellules caliciformes, sur les parois des cryptes, on trouve les cellules épithéliales qui absorbent l'eau et les électrolytes au niveau de la membrane à bordure en brosse (Gosling, 2003; Eckert *et al.*, 1999, Gray *et al.*, 1995).

Le gros intestin est caractérisé par la présence d'une importante flore bactérienne qui permet la dégradation des résidus alimentaires non digestibles. Les mécanismes de putréfaction et de fermentation permettent cette dégradation finale. Ils impliquent des micro-organismes comme les bactéries et les levures, souvent anaérobiques, ainsi que plusieurs enzymes de type anaérobie (Gosling, 2003). La muqueuse colique est semblable à celle de l'intestin grêle. Cependant, il n'y a pas de cellules de Paneth et les cellules caliciformes sont plus nombreuses. Les glandes de Lieberkühn sont toujours présentes, mais les villosités

intestinales sont absentes. En comparaison avec les entérocytes de l'intestin grêle, ceux présents dans le côlon possèdent aussi une membrane à bordure en brosse à leur apex, mais elle possède moins d'enzymes et sa variété enzymatique est beaucoup moins complète, ce qui explique son rôle restreint dans la digestion et l'absorption des substances nutritives (Gosling, 2003; Eckert *et al.*, 1999, Gray *et al.*, 1995).

1.1.3 Caractéristiques et fonctions de la barrière intestinale

Le petit et le gros intestin possèdent de puissants mécanismes de réparation et de défense de sa muqueuse. Les composants de cette barrière muqueuse intestinale incluent les sécrétions luminales (le mucus), les cellules épithéliales intestinales ainsi que plusieurs autres cellules immunes spécialisées. L'épithélium intestinal constitue la couche de cellules qui recouvre les villosités et qui fait la liaison entre la lumière intestinale et l'intérieur de l'organisme. Il empêche les solutés indésirables, les microorganismes et les antigènes luminaux d'entrer dans la circulation systémique (Watson *et al.*, 2005; Clayburgh *et al.*, 2004). Une dérégulation de la fonction de réabsorption, lors d'une infection bactérienne par exemple, entraîne l'apparition de diarrhées. L'épithélium intestinal est directement affecté dans les cas des maladies inflammatoires intestinales (MII) et les cellules qui le composent sont impliquées dans les processus d'initiation, de développement, de maintien, de rétablissement ou d'aggravation de la maladie (Watson *et al.*, 2005; Clayburgh *et al.*, 2004).

L'épithélium est constitué d'entérocytes absorbants (Bjerknes *et al.*, 2005), des cellules caliciformes ou à Gobelet responsables de l'assemblage des mucines et de 'trefoil peptide' nécessaires pour la croissance et la réparation de l'épithélium (Shaoul *et al.*, 2004), des cellules entéro-endocrines ou sécrétrices d'hormones (Strader *et al.*, 2005) et des cellules de Paneth qui sécrètent des cryptidines et défensines antimicrobiennes ainsi que des facteurs de croissance et des enzymes digestives (Wehkamp *et al.*, 2005). Cet épithélium est aussi parsemé de lymphocytes et est en association avec plusieurs autres cellules immunes ainsi que certaines cellules et structures spécialisées dans la défense de l'organisme au niveau de l'intestin, soit les cellules M, les plaques de Peyer ainsi que les lymphocytes et autres cellules immunes de la lamina propria. La barrière intestinale qui protège l'hôte contre des agents

pathogènes ou des antigènes indésirables est composée d'une couche de mucus, de l'épithélium, de la lamina propria qui est le site principal des cellules du système immunitaire, ainsi que de vaisseaux, de l'innervation et des cellules musculaires lisses permettant le péristaltisme intestinal (revue dans Van Gossum, 2007).

1.1.4 Le système immunitaire intestinal

Les cellules de l'épithélium intestinal, en collaboration étroite avec le contenu intraluminal, jouent un rôle crucial dans la stimulation et la modulation du système immunitaire inné et adaptatif (Pickard *et al.* 2004). L'activation du système immunitaire inné est basée sur la reconnaissance de composants moléculaires bactériens par des récepteurs spécifiques, dont entre autres les récepteurs qualifiés de Toll-like receptors (TLR) et ceux de la famille des molécules avec un domaine NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain). La reconnaissance de composés bactériens par ces récepteurs va entraîner une réaction en chaîne très complexe activant des facteurs de transcription, comme le NF- κ B, qui stimulent la transcription de gènes codant pour la synthèse des cytokines pro- et anti-inflammatoires (revue dans Van Gossum, 2007).

1.1.5 La réponse immune intestinale

Le contact permanent entre l'épithélium digestif et le contenu intraluminal, y compris la microflore bactérienne, provoque dès lors une stimulation continue du système immunitaire au sein de la muqueuse digestive. Cela a donné lieu au concept d'inflammation physiologique de la muqueuse digestive, mise en évidence dans de nombreux travaux (revue dans Van Gossum, 2007).

Le système lymphoïde associé aux muqueuses de l'intestin communément nommé GALT (Gut associated lymphoid tissue) est une des masses de tissu lymphoïde la plus importante de l'organisme et il joue un rôle fonctionnel fondamental. Il est impliqué dans la prévention de la pénétration des pathogènes au niveau de la muqueuse intestinale, et au traitement des nombreux antigènes contenus dans la lumière intestinale, afin d'induire un état

de tolérance à leur égard. Il est souvent divisé selon ses parties différentes: les plaques de Peyer (PP), la lamina propria (LP) et les lymphocytes intraépithéliaux (IEL). Il comprend aussi les ganglions lymphatiques et les ganglions mésentériques associés à la région intestinale, ainsi que plusieurs types de cellules telles que les lymphocytes intraépithéliaux, les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules M, et les cellules T régulatrices (Tregs) (revue par Spahn et Kurchazik, 2004).

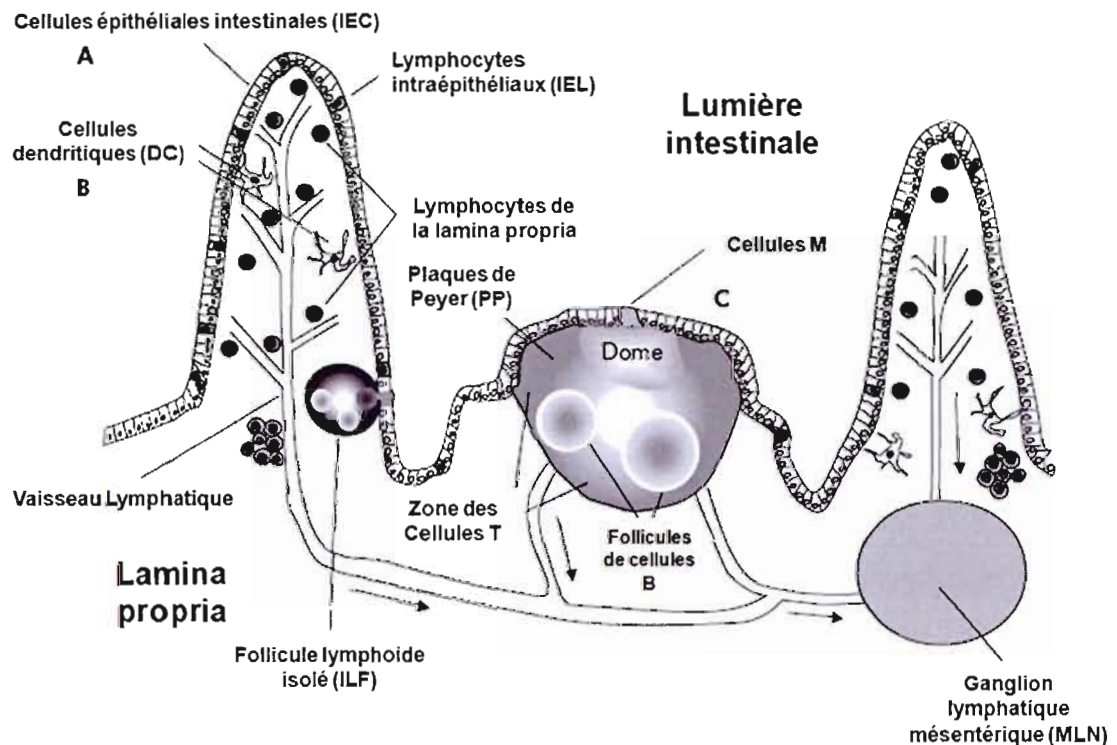


Figure 1.1: Schéma des éléments lymphoïdes de l'intestin associés au système lymphatique. Les plaques de Peyer (PP) et les ganglions mésentériques (MLN) sont des follicules lymphoïdes intestinaux organisés. (A-C) Voie d'absorption des antigènes: les antigènes luminaux peuvent être capturés par (A) les cellules épithéliales intestinales, (B) par les cellules dendritiques de la lamina propria et par (C) les cellules M. Le drainage lymphatique des plaques de Peyer et de la lamina propria s'effectue vers les ganglions mésentériques (Modifiée de Spahn et Kurchazik, 2004).

Le GALT est organisé en 2 types de structures, les sites inducteurs et les sites effecteurs. Les sites inducteurs correspondent à des follicules lymphoïdes isolées ou formant de volumineux agrégats de dizaines de follicules à l'intérieur de la muqueuse. Dans le cas de l'intestin il s'agit de l'appendice iléo-caecal et des plaques de Peyer. Celles-ci sont les structures les plus typiques et les plus importantes pour l'induction des réponses immunes dans le tube digestif. Elles sont réparties tout le long de l'intestin grêle et sont particulièrement abondantes dans l'iléon. Les plaques de Peyer forment un dôme dans la lumière de l'intestin dans une zone dépourvue de villosités intestinales. À ce niveau, l'épithélium est composé d'entérocytes à bordure en brosse moins haute et surtout de cellules spécialisées, les cellules M pour 'microfold'. Celles-ci sont des entérocytes qui se sont différenciés au contact des lymphocytes B, et ont pour fonction de capturer les antigènes solubles ou particuliers (germes entiers) par endocytose et de les livrer intact à leur pôle basal où ils sont immédiatement pris en charge par des macrophages ou des cellules dendritiques, abondants dans cette portion sous-épithéliale. Plus en profondeur se trouvent les follicules lymphoïdes, de structure identique à celle des ganglions, entourés de zones inter-folliculaires riches en lymphocytes T arrivant du sang par les HEV abondantes également dans cette localisation de la plaque. La circulation lymphatique qui naît dans le chorion des villosités intestinales (chylifères) se réunit en une sorte de plexus en forme de panier à la partie inférieure de la plaque de Peyer, avant d'aller former de vastes réseaux complexes dans la sous-muqueuse, la musculuse et l'adventice (revue dans Spahn et Kurchazik, 2004; revue dans Schatzmann Peron *et al.*, 2009).

Les ganglions mésentériques sont les ganglions les plus volumineux de l'organisme. Ils jouent un rôle déterminant dans le développement des réponses immunes du tube digestif, aussi bien dans leur aspect tolérogène qu'immunogène. Alors que l'absence de plaques de Peyer chez l'animal n'affecte que partiellement ces réponses immunes, celles-ci sont totalement abrogées par l'inhibition du développement des ganglions mésentériques (revue dans Spahn et Kurchazik, 2004).

De façon simplifiée, la sensibilisation des lymphocytes T et B de la plaque de Peyer se déroule de la façon suivante. L'antigène acheminé jusqu'aux ganglions mésentériques soit à

l'état libre soit par les cellules dendritiques va activer les lymphocytes T naïfs parvenus dans le ganglion via les HEV. Cette sensibilisation dans un microenvironnement riche en cytokines spécifiques va stimuler l'expression de récepteurs de 'homing', particulièrement l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et le récepteur de chimiokine CCR9, permettant à ces lymphocytes de retourner dans le chorion de la muqueuse intestinale par des HEV possédant les ligands complémentaires (revue dans Spahn et Kurchazik, 2004; Fong, 2002).

Les sites effecteurs sont des infiltrats plus ou moins denses de lymphocytes situés dans le chorion des muqueuses au niveau de l'intestin. Le chorion de la muqueuse digestive est infiltré de cordons de cellules lymphoïdes où se mêlent un grand nombre de lymphocytes T mais également des plasmocytes synthétisant des immunoglobulines dont les deux tiers produisent l'isotype IgA de type sécrétoire. Ces IgA dimériques peuvent se lier au récepteur des Ig polymériques (poly Ig receptor), encore appelé composant sécrétoire, situé à la face latéro-basale des entérocytes. Le complexe IgA-composant sécrétoire est véhiculé alors au travers de la cellule jusqu'au pôle apical, où le composant sécrétoire subit un clivage auto-protéolytique de sa partie intra-membranaire et l'IgA, toujours associé de façon covalente aux domaines extra cellulaires du composant sécrétoire, est libérée dans la lumière intestinale. La fonction essentielle des IgA est d'empêcher la liaison des agents pathogènes aux cellules épithéliales et donc leur entrée dans la muqueuse. On trouve également dans les muqueuses de nombreux lymphocytes intra-épithéliaux. Ceux-ci, que l'on trouve étroitement associés aux entérocytes, sont de phénotype T (avec un % élevé de lymphocytes à TCR $\gamma\delta$ ou de phénotype NK (revue dans Spahn et Kurchazik, 2004; revue dans Schatzmann Peron *et al.*, 2009).

Les lymphocytes B de la plaque de Peyer, stimulés par l'antigène libre diffusant à leur contact au travers des vaisseaux lymphatiques vont coopérer avec les lymphocytes T activés puis vont emprunter la circulation lymphatique efférente, gagner les ganglions mésentériques pour y achever leur maturation. Par le canal thoracique, ils gagneront la circulation sanguine générale et retourneront dans le chorion où s'est produit leur stimulation et, devenus des plasmocytes matures ils pourront y sécréter des IgA pendant de nombreux mois (revue dans Spahn et Kurchazik, 2004). Dans l'intestin, les cellules IgA⁺ et les IgA sécrétoires jouent un

rôle important comme première ligne de défense de l'hôte. Cette immunoglobuline exerce l'exclusion immune par la coopération intime avec les mécanismes de défense innés non spécifiques (Brandtzaeg *et al.*, 1987).

1.1.6 Les populations lymphoïdes intestinales

La réponse immune locale sert à contenir et prévenir les infections par les pathogènes dans l'intestin, tout en prévenant leur dissémination aux sites systémiques. Les différents mécanismes de défense, de tolérance et ceux associés à l'inflammation sont régulés par une multitude de cellule immunitaires. Plusieurs sous-types différents de cellules immunitaires sont présents dans la muqueuse intestinale: les lymphocytes T auxiliaires (T-helper) CD4+ (Th1, Th2, Th17), les lymphocytes T-cytotoxiques (CD8+), les lymphocytes TCR $\gamma\delta$ et TCR $\alpha\beta$, les cellules tueuses naturelles dites 'natural killer' (NK), les cellules NK-T, les cellules T régulatrices FoxP3+, les lymphocytes B (CD19+), les neutrophiles, ainsi que les cellules présentatrices d'antigène tels les macrophages et les cellules dendritiques. Elles contribuent toutes à la réponse immune mucoale en sécrétant une variété de cytokines, chimiokines, d'anticorps et de molécules (Blaschitz *et al.*, 2010; Ramiro-Puig *et al.*, 2008). Les populations lymphocytaires retrouvées dans le tissu intestinal diffèrent de celles des organes lymphoïdes systémiques puisque les lymphocytes TCR- $\gamma\delta$ et TCR- $\alpha\beta$ sont tous deux présents dans la muqueuse intestinale et qu'ils sont de phénotypes CD4+CD8+, CD4+ ou CD8+ (Ohtsuka *et al.*, 1994).

L'intestin contient une population très variée de lymphocytes T. Même si cette population est hétérogène, deux sous-groupes se distinguent par le type de récepteur cellulaire T ou TCR (T cell receptor) et l'expression de co-récepteurs spécifiques (Hayday *et al.*, 2001). Le premier groupe, ou cellules de "type a", est constitué de cellules CD4+TCR $\alpha\beta$ + restreintes par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II et de lymphocytes CD8 $\alpha\beta$ + restreintes par le CMH-I. Ces cellules de type 'a' ressemblent aux cellules T conventionnelles retrouvées dans le sang, la rate ou les autres organes lymphoïdes secondaires. Une fois ces cellules activées, elles vont migrer aux sites effecteurs de l'intestin pour y résider en tant que cellules T mémoires effectrices de longue durée (Femke *et al.*,

2009). Le second groupe, ou cellules de "type b", expriment soit le $\text{TCR}\alpha\beta$ ou le $\text{TCR}\gamma\delta$ et aussi fréquemment la molécule $\text{CD8}\alpha\alpha$, mais sans l'expression des co-récepteurs typiques CD4 ou $\text{CD8}\alpha\beta$ (Femke *et al.*, 2009).

Les différents sous-types de lymphocytes T de la muqueuse intestinale sont présents en quantité variable dans les différentes parties de la muqueuse, selon la localisation : petit intestin versus côlon, selon le tissu : plaque de Peyer, lamina propria, lymphocytes intra-épithéliaux (IEL), mais aussi en fonction de l'âge, de l'espèce, de la race ainsi que des habitudes de vie et de l'état de santé du système immunitaire de l'individu. Cependant, de façon générale, la lamina propria (LP) est majoritairement composée de cellules de type 'a' tandis que l'épithélium est beaucoup plus riche en cellules de type 'b' (Femke *et al.*, 2009).

Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin ou GALT sont divisés en 2 sections, le tissu organisé et le tissu diffus. Les tissus organisés, tels les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques, sont des sites inducteurs de la réponse immune. Les tissus diffus, tels la LP ou les IELs, sont des sites effecteurs de la réponse immune (Mowat, 2003; Ramiro-Puig *et al.*, 2008)

Les plaques de Peyer contiennent des lymphocytes T, surtout des cellules T helper (CD4^+) et cytotoxiques (CD8^+), des cellules dendritiques matures et des macrophages. Ces plaques contiennent aussi plusieurs follicules composées de lymphocytes B IgM^+ , qui sont des cellules plasmatiques précurseurs des cellules qui produisent les IgA. (Mowat, 2003; Guillianio *et al.*, 2001; Newberry *et al.*, 2005). Les plaques de Peyer se distinguent aussi par leur intéressante population de cellules $\text{CD8}^+ \alpha\alpha$, qui s'y retrouvent en aussi grande quantité que dans le plus grand organe lymphoïde, la rate. Cependant, ces lymphocytes T $\text{CD8}^+ \alpha\alpha$ intestinaux semblent capables de reconnaître un plus large éventail de déterminants antigéniques que les lymphocytes T CD8^+ périphériques (Guy-Grand *et al.*, 1993; Ramiro-Puig *et al.*, 2008), ce qui favorise une meilleure protection contre la flore bactérienne intestinale.

Les IELs occupent l'espace intra-épithélial, sous les jonctions serrées et au-dessus de la membrane basale. En considérant la large surface de la muqueuse intestinale, plus de 400m², et sa proportion en IEL par rapport aux cellules épithéliales (1:5-10), les IELs représentent une abondante population de cellules immunes (Kunisawa *et al.*, 2005). Leur population très hétérogène, comporte une majorité de celles de phénotype atypique suppresseur ou cytotoxique qui est spécifique des muqueuses (CD8 $\alpha\alpha$ +), ce qui diffère des autres tissus lymphoïdes où le type plus conventionnel CD4+ CD8 $\alpha\beta$ + prédomine (Haday *et al.*, 2001; Ramiro-Puig *et al.*, 2008)

Même si leur origine et développement sont encore mal définis (Eberl, 2005), il est reconnu que les IELs ont un phénotype typique de cellule activée et effectrice/mémoire, et avec leur capacité immunomodulatrice, peuvent permettre une réponse immédiate et hautement efficace envers les cellules épithéliales infectées. Les IELs jouent un rôle clé dans la prévention de l'initiation de la réponse immunitaire par des antigènes luminaux, donc ils médient le processus de tolérance orale (Cheroutre *et al.*, 2005).

Le nombre d'IELs est estimé à un IEL par 5-10 cellules épithéliales intestinales (IEC) dans le petit intestin et à 1 IEL par 40 IECs dans le côlon chez la souris (Beagley *et al.*, 2009). Dans le petit intestin des souris, une large population d'IELs expriment le TCR $\gamma\delta$, la population restante consiste d'IELs TCR $\alpha\beta$ + qui sont surtout des cellules TCR $\alpha\beta$ + CD8 $\alpha\alpha$ +, d'un sous-groupe d'IELs TCR $\alpha\beta$ + CD8 $\alpha\beta$ + et de quelques IELs TCR $\alpha\beta$ + CD4+, en faible quantité (Femke *et al.*, 2009). Chez l'humain, la proportion de cellules TCR $\gamma\delta$ est moindre (environ 10%), mais ce nombre augmente significativement lors de troubles allergiques ou de maladies inflammatoires, telles la maladie céliaque (Spencer *et al.*, 1991). Le type conventionnel d'IEL CD4+ est plus abondant dans le côlon, environ 30% des IELs totaux. Les lymphocytes T retrouvés dans la LP consistent majoritairement de cellules de type 'a' CD4+ T helper (Th) et de IELs CD8+ en quantité moindre. L'intestin contient aussi quelques sous-types non-conventionnels intéressants de cellules T, telles que les cellules NKT ou autres cellules T qui interagissent avec des molécules de MHC non classiques (Femke *et al.*, 2009).

La plupart des cellules T mucosales de type 'b' résident dans le tissu épithélial du petit intestin et expriment soit le TCR α ou TCR $\gamma\delta$. Même si ces IELs de type 'b' TCR $\gamma\delta$ + et TCR $\alpha\beta$ + sont clairement différents ils partagent certaines caractéristiques non conventionnelles qui les distinguent du type 'a' (Pennington *et al.*, 2009). Les IELs de type 'b' contiennent un nombre important de cellules T auto-réactives. En plus de ce phénotype activé, ils expriment typiquement la molécule homodimère CD8 $\alpha\alpha$, et n'expriment pas les co-récepteurs CD4 ou CD8 $\alpha\beta$ et montrent souvent un déficit en marqueurs typiques des cellules T, incluant le CD2, le CD28 et le Thy-1. (Pennington *et al.*, 2009; Femke *et al.*, 2009).

Même si la reconnaissance des ligands par les IELs TCR $\gamma\delta$ + demeure exclusive, les données de plusieurs expériences suggèrent que les cellules TCR $\gamma\delta$ + sont activées avant la reconnaissance par le TCR ou que cette activation est médiée par le récepteur des cellules NK d'un groupe limité de déterminants antigéniques conservés. Dans certains cas, ces cellules peuvent directement reconnaître des antigènes non-apprêtés (Thedrez *et al.*, 2009; Femke *et al.*, 2009).

Une des caractéristiques les plus importantes des IELs de type 'b' est ce phénotype de cellules «activées mais au repos». Bien que ces cellules soient cytolytiques lors de leur isolement de l'épithélium intestinal, en absence de sur-stimulation elles ne semblent pas se comporter comme des cellules T activées. Elles ont une capacité de prolifération limitée et leur présence est souvent corrélée avec l'état de quiescence immune au lieu de celui d'une immunité productive (Femke *et al.*, 2009).

Mis ensemble, ces résultats supportent la possibilité d'un rôle immunorégulateur pour les IELs de type 'b'. Bien que nous soyons toujours loin de comprendre entièrement la fonction physiologique des IELs de type 'b', ils semblent être principalement impliqués dans la régulation immune (auto-réactive) et l'entretien de l'homéostasie immune de l'intestin comme dans l'hypothèse déjà énoncée 30 ans plus tôt par Ferguson (1977).

Le petit intestin contient surtout des IELs mémoire de types CD8 $\alpha\beta$ +TCR $\alpha\beta$ + qui montrent une fonction effectrice cytolytique. Comparées aux cellules T mémoire centrales de

la rate, ces cellules effectrices T mémoires peuvent être rapidement activées et peuvent fournir des réponses cytotoxiques initiales immédiates lors d'une infection locale (Masopust *et al.*, 2001). Même si les IELs sont surtout des cellules cytotoxiques CD8 $\alpha\beta$ +, les cellules T CD4+ sont aussi présentes dans l'épithélium, spécialement dans le côlon. Cependant, elles sont présentes en plus grande proportion dans les lymphocytes de la LP (Femke *et al.*, 2009).

La LP, placée entre l'épithélium et la *muscularis mucosae*, contient des lymphocytes B matures (CD19+), qui produisent des IgA, des lymphocytes T principalement de type Th (CD4+) et plusieurs autres types cellulaires tels les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes (Lefrançois *et al.*, 2006). Ces cellules sont toujours en migration, en différenciation et en renouvellement continu (Shanahan *et al.*, 1994; Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

Tous les types classiques de cellules CD4+ Th sont retrouvées dans la LP, incluant les cellules de type Th1 qui dirigent la réponse médiée par les cellules associées aux infections intracellulaires et la cytotoxicité, ainsi que celles du type Th2 qui sont impliquées dans la production d'IgE, le contrôle des infections aux helminthes et les allergies. Cependant, au cours des dernières années il est devenu évident que la LP est aussi le siège d'une population particulière de cellules Th qui produisent constamment des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL)-17A, l'IL-22, et l'IL-17F, les cellules appelées Th17, ainsi qu'une population importante de cellules T régulatrices exprimant le facteur de transcription FoxP3 (Tregs) (Femke *et al.*, 2009).

Les cellules Tregs exprimant le Foxp3+ sont reconnues pour jouer un rôle important dans l'homéostasie intestinale et il a été prouvé qu'une mutation du gène du gène FoxP3 cause directement de l'inflammation intestinale (Gambineri *et al.*, 2003). En effet, il a été démontré que le transfert de cellules Tregs peut inhiber l'inflammation et même la guérir dans un modèle de transfert de cellules T naïves lors de colite (Uhlir *et al.*, 2006). Les mécanismes d'action des Treg incluent la production de cytokines, telles l'IL-10 et le TGF- β , ainsi que l'expression de récepteurs inhibiteurs tels CTLA-4. Les lymphocytes Tregs périphériques et

dans le thymus, s'accumulent préférentiellement dans la LP de l'intestin, tout comme les lymphocytes Th17 (Miyara *et al.*, 2009; Femke *et al.*, 2009).

Le sang, les tissus lymphoïdes, le placenta et les muqueuses contiennent aussi des sous-populations de diverses cellules NK qui possèdent des fonctions immunes distinctes. Des études récentes ont montré que les humains et les souris hébergent un sous-ensemble unique de cellules de NK dans les tissus lymphoïdes associées à l'intestin et qui se spécialisent dans la production d'IL-22. Cette cytokine joue un rôle dans la défense des barrières mucosales de l'hôte, la dérégulation de la sécrétion de cette cytokine peut causer des maladies auto-immunes (Colonna *et al.*, 2009).

Jusqu'à récemment, la littérature disponible sur les cellules NK résidant dans les muqueuses intestinales, dans la LP et l'épithélium, était rare et le phénotype et la fonction des cellules NK de l'intestin n'avaient pas suscité beaucoup d'attention, cependant aujourd'hui plusieurs chercheurs s'intéressent à leur implication dans les MII (Sanos *et al.*, 2009). Toutes les cellules NK des souris C57BL/6 expriment la molécule de surface NK1.1 en plus d'un sous groupe hétérogène de cellules T, incluant les cellules CD4- CD8-, les cellules CD4+ et les cellules CD8+, généralement nommées cellules NKT, parmi lesquelles certaines reconnaissent les antigènes présentés par un CMH particulier, le CD1d (Godfrey *et al.*, 2000; Bendelac *et al.*, 1995). Le rôle précis de ces cellules NKT au niveau intestinal est encore mal compris.

Les approches cliniques et expérimentales récentes ont démontré que les cellules B jouent aussi des rôles majeurs dans la manifestation de la maladie auto-immune non seulement par les mécanismes bien établis tels la cytotoxicité médiée par les auto-anticorps mais également par une variété d'autres fonctions (Fujimoto *et al.*, 2007). Les cellules B sécrètent des anticorps contre les antigènes indésirables provenant de la lumière intestinale, surtout des IgA. Les IgM y sont aussi présents, mais demeurent fixés à la cellule (Farstad *et al.*, 2007). Les fonctions des cellules B sont sous le contrôle des signaux induits par le récepteur d'antigène des cellules B, le BCR (B cell receptor) et par les co-récepteurs cellulaires de surface spécialisés, ou régulateurs de réponse, qui informent les cellules de B

sur leur microenvironnement. Ces régulateurs de réponse incluent le CD19 et le CD22. Ces deux molécules régulent les signaux du BCR de façon conjointe et dépendante, CD19 régule la phosphorylation du CD22, alors que CD22 empêche la phosphorylation du CD19. Cette boucle CD19 CD22 est associée à un phénotype auto-immun chez les souris et peut être une cible thérapeutique potentielle dans les maladies auto-immunes (Fujimoto *et al.*, 2007). Plusieurs modifications dans la population de cellules B CD19⁺ intestinales ont été remarquées dans la muqueuse intestinale de patients avec la maladie de Crohn (Yacyshyn *et al.*, 1993) suggérant un rôle de ces cellules dans la pathogénèse de cette maladie.

1.1.7 La tolérance immunologique intestinale

Un point important, propre à l'immunité intestinale, est celui d'un état de tolérance immune. La sensibilisation des cellules dendritiques se produit dans un environnement de cytokines immunosuppressives, avec une abondance du TGF- β provenant des entérocytes, d'IL-10 issu entre autre des lymphocytes T et de la prostaglandine (PG) E2 provenant des macrophages. La tolérance immunitaire intestinale dépend principalement de la production de ces cytokines immunosuppressives, telles les l'IL-4, l'IL-10, le TGF- β et la PGE2 (Nagler-Anderson C., 2000). L'IL-10 et le TGF- β sont les principales cytokines produites par les cellules T régulatrices (Treg) qui contrôlent le niveau d'inflammation tout en augmentant la production d'anticorps IgA présents à la surface de la muqueuse intestinale. L'IL-10 peut aussi être produite par les macrophages/cellules dendritiques et les cellules épithéliales intestinales (De Wall *et al.*, 1992; Parry *et al.*, 1997). Son rôle principal est d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , les IL-1, IL-6, IL-12, l'IFN- α et l'IL-8 et de bloquer la production d'IFN- γ et d'IL-2 par les lymphocytes CD4⁺ activés (Parry *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 1992). Il a été montré que l'IL-10 et le facteur TGF- β sont aussi essentiels au développement des lymphocytes T régulateurs favorisant une amplification du contrôle des cytokines inflammatoires (Groux *et al.*, 1997). Aussi, dans des modèles expérimentaux de colite inflammatoire, l'administration d'IL-10 recombinante a supprimé l'inflammation (Powrie *et al.*, 1994). Les rôles importants de l'IL-10 et du TGF- β dans la suppression des lymphocytes pro-inflammatoires CD4⁺ Th1/Th17 donnent donc ouverture à la recherche d'outils d'amélioration de l'homéostasie intestinale. Ces médiateurs

influencent la maturation des cellules dendritiques de telle façon qu'elles génèrent une réponse immune très biaisée vers la production d'IgA et dans une moindre mesure vers les cellules CD4⁺ de types Th2 (IL-4) et Th3 (IL-10). Cet état de tolérance de réponse immune est la voie normale, par défaut, prévenant le développement de réactions inflammatoires inappropriées. Mais l'arrivée d'agents pathogènes capables d'induire une maturation et une activation importante des cellules dendritiques, peut entraîner la biosynthèse d'IL-12 et le développement d'une réponse Th1 inflammatoire efficace (Groux *et al.*, 1997).

L'administration d'antigènes par la voie orale entraîne l'induction d'une tolérance dite 'orale'. Cette tolérance se caractérise par la suppression des réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorale (revue dans Gonnella, 1998). Selon la concentration de l'antigène, cette tolérance orale résulte soit de l'anergie, de la délétion ou de l'induction des lymphocytes Treg (Witacre *et al.*, 1991; Melamed *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995). Les lymphocytes T générés durant le développement de cette tolérance orale produisent les cytokines suppressives IL-4, IL-10 et TGF- β (Chen *et al.*, 1994, Miller *et al.*, 1992). Les cellules Treg productrices de TGF- β se retrouvent dans les plaques de Peyer mais des cellules Treg produisant aussi de l'IL-4 et de l'IL-10 sont produites dans les ganglions mésentériques. L'induction de cette tolérance orale a été utilisée pour traiter des maladies auto-immunes chez l'animal et chez l'humain (Weiner, 1997).

1.2 Rôle de la flore microbienne dans la régulation de l'état immunitaire de l'intestin

1.2.1 La barrière intestinale

La barrière intestinale qui protège l'hôte contre des agents pathogènes ou des antigènes indésirables est composée d'une couche de mucus, de l'épithélium, de la LP, des vaisseaux et des terminaisons nerveuses contrôlant le péristaltisme intestinal. La flore bactérienne ne constitue pas seulement un autre composant de cette barrière mais réagit en symbiose avec plusieurs de ces compartiments. Ainsi, la flore bactérienne stimule la composante «sécrétoire» de cette barrière, par la production de la couche de mucus et des peptides antibactériens et, par ailleurs, favorise la composante «physique» de cette barrière, par la

production de substances protégeant ou réparant l'épithélium (N-cadhérine, acides gras à chaînes courtes, etc.) (Mahida, 2004).

1.2.2 Espèces bactériennes de la microflore intestinale

La microflore intestinale contient jusqu'à 500 souches de bactéries différentes, mais seulement 30 à 40 souches constituent 90 % de la totalité de cette microflore. Les espèces de bactéries anaérobies comme les bifidobactéries, les eubactéries, les streptocoques, les lactobacilles, sont prédominantes dans l'intestin. La flore bactérienne est constituée de souches qui colonisent le tractus digestif dès la naissance de l'individu, ainsi que de souches qui envahissent le tube digestif au cours de l'ingestion d'aliments ou de boissons. Actuellement, il est courant de distinguer la microflore intraluminaire de la flore adhérente à la muqueuse (Guarner, 2006). La densité du contenu bactérien dans le tube digestif est fortement variable en fonction du niveau anatomique. Le nombre de bactéries est estimé à 10^3 dans l'estomac 10^4 dans le jéjunum, 10^7 dans l'iléon terminal et atteint 10^{12} dans le gros intestin (Eckburg *et al.* 2005). Les bactéries digestives ont des fonctions métaboliques, protectrices et trophiques. Au niveau métabolique, les bactéries du système digestif produisent des acides gras volatils à courtes chaînes servant de source d'énergie aux colonocytes, fournissent de la vitamine K, facilitent l'absorption des ions, métabolisent les xénobiotiques et facilitent le métabolisme hépatique des lipides et le transit intestinal (Eckburg *et al.* 2005). Les bactéries participent aux défenses de la «barrière intestinale» principalement par compétition avec les autres microorganismes, en utilisant les nutriments, en modifiant le pH intraluminal et en occupant des sites potentiels de colonisation. De plus, elles sécrètent, au niveau de la surface épithéliale, des molécules antimicrobiennes, telles les bactériocines, et entrent en compétition pour l'accès à des récepteurs de l'hôte. Les bactéries jouent un rôle trophique en facilitant la prolifération et la différenciation épithéliale et en stimulant le système immunitaire (Eckburg *et al.* 2005; Guarner, 2006).

Globalement, on reconnaît que la flore luminale joue davantage un rôle métabolique et participe à la barrière intestinale alors que la flore adhérente de la muqueuse a plus une fonction trophique (revue dans Van Gossum, 2007).

1.3 Les maladies inflammatoires intestinales humaines

1.3.1 La maladie de Crohn et la colite ulcérate

Les MII touchent de plus en plus de gens, surtout dans les pays développés, comme ceux de l'Amérique du Nord et de l'Europe (Baumgart et Carding, 2007). L'inflammation aigue ou chronique du tube digestif entraînent des maladies graves et un facteur de risque de cancer colorectal chez l'homme et l'animal (Hinton, 1966). Les MII comprennent deux pathologies majeures, soit la maladie de Crohn et la rectocolite ulcéro-hémorragique ou colite ulcérate, alors que dans 10% des cas, les colites sont dites indéterminées (Van Gossum, 2007). Cependant la distinction entre les 2 maladies demeure ambiguë. La colite ulcérate comprend 2 maladies différentes : la colite ulcérate extensive et la proto-colite distale. La maladie de Crohn, quant à elle, comprend une multitude de désordre inflammatoires intestinaux. Le facteur déterminant de ces maladies demeure inconnu. Comme ces maladies sont causées par un dérèglement de la réponse immunitaire intestinale, leur apparition peut dépendre de plusieurs facteurs, tels que des anomalies génétiques, le stress, l'alimentation, l'altération de la microflore bactérienne intestinale ou de la muqueuse intestinale, les habitudes de vie, l'environnement immédiat et la pollution (Kucharzik *et al.*, 2006; MacDonald *et al.*, 2005; Carol *et al.*, 1998).

La maladie de Crohn peut s'attaquer autant au petit (intestin grêle) qu'au gros intestin (côlon), tandis que la colite ulcérate n'atteint que le côlon. La maladie de Crohn apparaît généralement entre l'âge de 20 et 40 ans, mais parfois chez des individus beaucoup plus jeunes, et elle est plus fréquente chez les caucasiens. La colite ulcérate débute généralement entre l'âge de 30 et 50 ans et touche plus les femmes (Baumgart, 2009). Les principaux symptômes des MII vont des selles anormales en nombre et en volume à la diarrhée chronique associée à des douleurs abdominales. D'autres symptômes, comme la fièvre et une atteinte inflammatoire des articulations, de la peau et d'autres organes, peuvent aussi se manifester. En plus de ces symptômes, ces maladies causent aussi des problèmes d'absorption intestinale entraînant des carences et un retard de croissance chez les plus jeunes (Baumgart, 2009). L'évolution de ces maladies se fait par cycles. Les périodes de crise sont

suivies d'une rémission. Cependant, la maladie peut évoluer d'un coup et les périodes de rémissions peuvent être de durée variable. Une guérison totale est très improbable, mais il est possible d'atténuer les symptômes de la maladie (Baumgart, 2009).

1.3.2 Les lésions intestinales de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse

Les MII partagent plusieurs caractéristiques communes et il est souvent difficile, voire impossible, de déterminer de quel type de maladie il s'agit. Dans ces cas, la maladie est classée comme une maladie intestinale inflammatoire de type indéterminé (revue dans Baumgart, 2009). Les lésions intestinales observées lors de ces maladies se caractérisent par des lésions dites architecturales et des modifications inflammatoires (revue dans Geboes *et al.*, 1999). Les lésions inflammatoires se caractérisent par une augmentation de l'intensité de l'infiltrat inflammatoire dans la LP, une augmentation des plasmocytes, la présence d'amas lymphoïdes et de granulomes épithélioïdes ou de cellules géantes isolées.

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire transmurale de la muqueuse intestinale avec progression épisodique. Elle peut affecter chaque partie de l'appareil gastro-intestinal, de la bouche à l'anus (Stange *et al.*, 2006; Silverberg *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2008). Le diagnostic de la maladie de Crohn est basé sur la présence d'ulcères intestinaux longitudinaux ou des déformations induites par des ulcères ou des motifs en pavés ronds, la présence de petites ulcérations aphteuses dans le tube digestif supérieur et inférieur avec granulomes non-caséux (Toshiyuki *et al.*, 2003). Dans le cas de la maladie de Crohn les granulomes ne sont pas reliés aux cryptes, alors que les aggrégats lymphoïdes transmuraux sont présent partout dans les sites d'inflammation. De plus, l'inflammation transmurale profonde de la maladie de Crohn cause des fissures nombreuses et profondes, ainsi que l'apparition de fistules et sinus (revue dans Yantiss et Odze, 2006).

La colite ulcéreuse implique une inflammation non-transmurale, avec la progression graduelle, parfois épisodique, qui est limitée au côlon et au rectum, pour finalement atteindre le stade de colite fulgurante (Stange *et al.*, 2008; Hoffmann *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2008). Le diagnostic de la colite ulcéreuse est basé sur la présence de diarrhée, de sang ou

de pus dans les selles, sur la présence d'inflammation macroscopique continue de la muqueuse qui affecte le rectum en continuité avec le côlon, sur la présence de lésions histopathologiques dans la muqueuse associées à la colite ulcéreuse, tel la présence de granulomes reliés aux cryptes en inflammation et l'absence d'aggrégats lymphoïdes transmuraux (Toshiyuki *et al.*, 2003).

La maladie de Crohn se distingue de la colite ulcéreuse par le fait que dans la première, il y a présence de granulomes épithélioïdes et d'une hétérogénéité de l'infiltrat inflammatoire avec des lésions légères au niveau des cryptes avec des réactions inflammatoires focales alors que dans la seconde, la réaction inflammatoire dans la muqueuse intestinale est plus diffuse, homogène et couvre entièrement la muqueuse (revue dans Geboes *et al.*, 1999).

1.3.3 Anomalies immunitaires associées aux maladies inflammatoires intestinales

Une cascade de médiateurs inflammatoires comme les cytokines sont des molécules-clés dans les réponses immunes innées et adaptatives. Elles modulent les fonctions cellulaires et biologiques importantes qui déclenchent les voies de signalisation en aval impliquées qui régulent la différenciation et la prolifération des cellules immunes (O'Shea *et al.*, 2008). En condition normale, la muqueuse intestinale fonctionne avec un équilibre délicat de cellules inflammatoires où les cytokines synthétisées et les signaux de transduction des voies de signalisation induites par les cytokines sont étroitement régulés par des mécanismes complexes de rétroaction et par les cellules Tregs (O'Shea *et al.*, 2008; Ihle, 1995)

Dans les MII, la réponse immune physiopathologique est dérégulée face aux antigènes des bactéries commensales, ce qui se manifeste par un débalancement sévère du profil de production des cytokines aux différents stades de la maladie (Pizarro *et al.*, 2007). Ce déséquilibre est souvent représenté comme une dominance ou un profil de polarisation T-helper 1 ou T-helper 2 dans les MII. La maladie de Crohn s'apparente à un désordre de type Th1 médié par le TNF- α , l'IL-12 et l'IFN- γ . La colite ulcéreuse est plutôt associée à une réponse de type Th2 médiée par l'IL-15 et sans prédominance de l'IFN- γ (Fuss *et al.*, 1996). Cependant, les concepts de polarisation Th1 et Th2 sont remis en cause par plusieurs études

qui montrent que la maladie de Crohn peut aussi s'apparenter à un profil de cytokines de type Th2 (augmentation d'IL-15) et que la colite ulcéreuse s'apparente aussi à un profil de cytokines de type Th1 (implication du TNF- α) (Fort *et al.*, 2001; Gor *et al.*, 2003; Tsukada *et al.*, 2002). Il est aussi important de mentionner l'intérêt récent pour la voie inflammatoire de type Th17 médiée par les IL-17 et IL-23, qui sont deux cytokines essentielles qui stimuleraient la production de cytokines inflammatoires lors de maladies chroniques intestinales (Yen *et al.*, 2006).

Le réseau de cytokines impliqué dans les MII est un système dynamique et complexe dans lequel les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance contrôlent l'initiation et la perpétuation de l'inflammation (Ihle, 1995). Jusqu'à présent, notre compréhension du rôle des cytokines dans les MII, autant dans les modèles humains qu'animaux, a permis de limiter les analyses à quelques petits groupes de cytokines. Cependant, il est clair que la redondance fonctionnelle, la synergie, la pléiotropie et la régulation concomitante résulte en un réseau dynamique de cytokines dépendant de la complexe interaction de multiples facteurs, plutôt que des effets isolés d'une seule molécule signal ou d'une seule voie (O'Shea *et al.*, 2008). Étant donné l'importance du réseau complexe de cytokines, des molécules immunomodulatrices, ainsi que leurs applications cliniques potentielles en tant qu'agents cibles, l'analyse et la compréhension des mécanismes de régulation de ces profils de cytokines est impérative pour développer de nouveaux tests diagnostics et de nouveaux traitements.

1.3.4 Les facteurs génétiques impliqués dans les MII chez l'humain

Les MII sont des désordres inflammatoires de l'intestin favorisés par une association de plusieurs gènes. La colite ulcéreuse et la maladie de Crohn sont donc des maladies polygéniques. Des régions de susceptibilité à ces maladies ont été trouvées sur 12 chromosomes, les chromosomes 16, 12, 6, 14, 5, 19, 1, 16 et 3 ces régions ont été renommées IBD1 à IBD9 respectivement (revue dans Mayer, 2010). Les mutations les plus connues pour leur incidence sur les MII sont IBD1 qui code pour CARD15 et qui est en association avec NOD2, IBD3 qui code pour la région HLA et le TNF- α , ainsi que IBD5 (OCTN1/2) (revue

dans Mayer, 2010). L'équipe du Dr John Rioux a découvert l'implication de nouveaux gènes qui constituent des facteurs de risques pour les MII, ces gènes codent pour les PHOX2B, NCF4 et ATG16L1 (autophagy-related 16 like 1 gene) et le gène de l'IL-23R (Rioux *et al.*, 2007; Weersma *et al.*, 2008). Le gène ATG16L1 est aussi associé à la maladie de Crohn. La mutation du gène codant pour l'IL-23R en un variant peu commun confère une forte protection contre la maladie de Crohn (revue dans Mayer, 2010).

1.4 Implication majeure des macrophages dans l'inflammation intestinale

Les macrophages sont importants dans les réponses immunologiques et inflammatoires de l'hôte. Il y a une grande population de ces cellules dans la muqueuse intestinale normale, où ils représentent la population principale de cellules présentatrices d'antigène capable de déterminer le type de réponses des cellules T développé face aux antigènes luminaux. Certaines études suggèrent que les macrophages intestinaux normaux ne peuvent pas être assez facilement induits pour des réponses inflammatoires aiguës. Dans les MII actives il y a une augmentation de la population de macrophages de la muqueuse, dérivés des monocytes de circulation (Mahida, 2000). Ces macrophages recrutés sont phénotypiquement différents de la population résidente et jouent un rôle important en régulant l'inflammation chronique de la muqueuse, constatée chez les patients atteints de colite ulcéreuse et de la maladie de Crohn. Les macrophages sécrètent beaucoup de cytokines qui sont importantes dans les réponses pro-inflammatoires, telles que l'interleukine-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, et le TNF- α . Ils libèrent également les métabolites réactifs de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NO), ainsi que des protéases qui dégradent la matrice extracellulaire. Les macrophages sont également importants pour la résolution de l'inflammation et la réparation de la muqueuse intestinale qui se produit durant la rémission de la maladie (Mahida, 2000).

1.4.1 Activation des TLRs chez les macrophages

Les macrophages peuvent reconnaître plusieurs composés provenant des pathogènes. Cette reconnaissance cause l'activation des macrophages qui déclencheront les mécanismes nécessaires à l'élimination du pathogène. La reconnaissance des motifs moléculaires

conservés des pathogènes ou PAMP se fait par les TLRs (récepteurs Toll-like). Il existe plusieurs TLRs chez la souris, chacun pouvant reconnaître des PAMP spécifiques. Ainsi, le TLR4 peut reconnaître le LPS, le TLR-2, les lipoprotéines, le peptidoglycane (PEP) des bactéries Gram+, les acides lipotéichoïques, les champignons, et les glycoprotéines virales (en association avec le TLR4), le TLR-3, l'ARN double brin, les TLR-7 et -8, l'ARN simple brin, le TLR-9, l'ADN bactérien non méthylé et le TLR-5, la flagelline (revue dans Akira, 2006). *L. kefiranofaciens* est une bactérie Gram positif dont la paroi contient surtout du PEP et pourra être reconnu surtout par le TLR-2 et par le TLR-9 si elle est sous une forme complète et phagocytable (Nair *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2008).

Afin d'étudier les mécanismes responsables de la production ou de l'inhibition de cytokines spécifiques par les différents produits de BiolActis, il est essentiel de comprendre les interrelations entre les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la production de ces cytokine. L'activation des macrophages par le PEP, reconnu pour se fixer au TLR-2, induit la production de la plupart des cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, IL-10, IL-12, PGE2) via les voies MAP kinase p38 et ERK 1/2, la molécule COX-2 et le facteur de transcription NF- κ B (Chen *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2001, Nair *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2000; Schwandner *et al.*, 1999).

La fixation du PEP sur le TLR-2 active la voie MAP kinase ERK qui induit la production de TNF- α et d'IL-6 via l'activation du facteur de transcription NF- κ B, et induit la production de PGE2 via l'activation de la COX-2 (Chen *et al.*, 2006, Gomi *et al.*, 2000). Suite à la production du TNF- α par des macrophages, cette cytokine se fixe sur son récepteur et active la MAP kinase p38, voie qui est principalement responsable de la production de l'IL-10 (Nair *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2000). L'activation de la MAP kinase p38 augmente la production de l'acide arachidonique qui est le précurseur de la PGE2. La PGE2 produite augmente la production de l'IL-6 (Gomi *et al.*, 2000). En présence de PGE2, lorsque le niveau d'IL-10 produit est suffisant, l'effet observé est une diminution de la production de l'IL-6 (Cheon *et al.*, 2006). Compte tenu que les produits BiolActis peuvent moduler ces voies, l'utilisation d'inhibiteurs peut nous renseigner sur l'implication de chacune des voies dans la modification de la production de cytokines par ces produits.

1.5 Cytokines et molécules impliquées dans l'inflammation intestinale

Les cytokines, particulièrement celles produites par les macrophages, jouent un rôle clé dans la modulation du système immunitaire. Elles sont rapidement synthétisées et secrétées par les cellules inflammatoires suite à la stimulation et induisent la production de molécules d'adhésion et d'autres médiateurs tels que les ROS, l'oxyde nitrique, les médiateurs lipidiques tels que les leucotriènes, les PG, et les facteurs d'activation des plaquettes (revue dans Rogler et Andus, 1998). Les cytokines induisent, amplifient, maintiennent, prolongent et terminent l'inflammation (Aggarwal *et al.*, 1994). Le rôle des cytokines a été étudié intensivement dans le système immunitaire associé aux muqueuses (Sartor, 1994; Elson *et al.*, 1995). Il a été démontré qu'elles sont déterminantes pour la nature de la réponse immune de la muqueuse. Dans les MII, plusieurs évidences montrent un déséquilibre de la balance entre les cytokines pro-inflammatoires et celles qui sont anti inflammatoires. L'augmentation du niveau des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et du TNF- α ont été détectées dans les cas de MII. Ces cytokines sont sécrétées par les macrophages, les monocytes, les lymphocytes, les neutrophiles polymorphonucléaires et parfois même par les cellules épithéliales intestinales. La synthèse de ces cytokines est induite par l'activation de Nf- κ B, impliqué dans la régulation de plusieurs gènes associés à l'inflammation (revue dans Rogler et Andus, 1998). Plusieurs autres molécules et cytokines peuvent être ou sont impliquées dans les MII, mais l'accent sera mis sur celles qui sont le plus en relation avec le projet de recherche présenté dans ce mémoire.

1.5.1 L'interleukine-1

L'IL-1 est un médiateur qui active plusieurs cellules immunes et inflammatoires (Dinarello, 1994). Elle est produite par plusieurs types de cellules incluant les monocytes/macrophages, neutrophiles et les cellules endothéliales. Le système de l'IL-1 comprend l'IL-1 α et l'IL-1 β . L'IL-1 est principalement produite par les macrophages de la muqueuse en inflammation, alors que les cellules épithéliales intestinales semblent être une importante source du récepteur antagoniste à l'IL-1 (IL-1ra) (Rogler *et al.*, 1997). L'IL-1 β

provoque la production d'IL-8 par les cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 (Parhar *et al.*, 2003; Ludmila *et al.*, 2006).

1.5.2 L'interleukine-6

L'IL-6 est produite par une grande variété de cellules et sa production est induite durant la phase aigue de la réponse inflammatoire. Les sources majeures d'IL-6 dans l'intestin sont les macrophages alors que la production d'IL-6 par les cellules épithéliales intestinales est plutôt mitigée (Rogler *et al.*, 1997; Kusugami *et al.*, 1995; Reinecker *et al.*, 1993). Un niveau d'IL-6 élevé est mesuré dans le sérum et dans les biopsies de la muqueuse des patients atteints de MII (Murata *et al.*, 1995; Mahida *et al.*, 1991; Gross *et al.*, 1992; Reimund *et al.*, 1996). Chez les patients sans traitement aux corticostéroïdes, le niveau d'IL-6 dans le sérum est directement relié au degré d'activité (niveau de gravité) de la maladie (Holtkamp *et al.*, 1995). La production d'IL-6 chez les macrophages activés par le peptidoglycane, suite à l'activation du récepteur TLR-2, est influencée par l'activité de la COX-2, par l'activation des récepteurs à prostaglandines EP2 et EP4, par le niveau de PGE2 produite, par l'activation de la protéine kinase A (PKA), ainsi que par l'activation de NF- κ B. Ces observations suggèrent une forte régulation de la production d'IL-6 par la PGE2, car ces voies ou molécules responsables de la stimulation de l'IL-6 sont aussi impliquées dans la synthèse de la PGE2 ou permettent à celle-ci d'exercer son effet via ses récepteurs (Chen *et al.*, 2006).

1.5.3 L'interleukine-8

Les sources d'IL-8 dans la muqueuse intestinale sont les macrophages, les cellules épithéliales et les fibroblastes. Plusieurs études ont montré une augmentation du niveau d'IL-8 dans la muqueuse intestinale inflammée (Sher *et al.*, 1995; Mitsuyama *et al.*, 1994; Mazzucchelli *et al.*, 1994; Daig *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1996). L'IL-8 est un chimio-attractant très puissant des neutrophiles et un activateur de ceux-ci (Daig *et al.*, 1996). Le niveau d'IL-8 au niveau du côlon est en corrélation directe avec le niveau macroscopique d'inflammation locale, spécialement chez les patients atteints de colite ulcéraire. Un très grand nombre de neutrophiles sont alors retrouvés dans les abcès des cryptes (Mazzucchelli

et al., 1994; Daig *et al.*, 1996). Le niveau d'IL-8 du côlon est en corrélation directe avec le nombre de neutrophiles retrouvés dans le tissu de la muqueuse (Mazzucchelli *et al.*, 1994). Il est suggéré que l'IL-8 et ses cytokines régulatrices, l'IL-1 et le TNF- α , occupent un rôle important dans la régulation de l'infiltration des neutrophiles dans la membrane intestinale, ainsi que dans l'initiation et le maintien des MII (revue dans Rogler et Andus, 1998).

1.5.4 L'interleukine-10

L'IL-10 est produite par les par les cellules T, les cellules B ou par les monocytes activés par le lipopolysaccharide (LPS) (Mosmann *et al.*, 1994, 1991). L'IL-10 peut aussi être produite par les macrophages suite à l'activation du TLR-2. L'IL-10 inhibe la production des cytokines des cellules Th1 pro-inflammatoires, lorsqu'elles sont activées dans des conditions qui requièrent la présence des cellules présentatrices d'antigènes, telles que les macrophages/monocytes, les lymphocytes B et les cellules dendritiques (revue dans Rogler et Andus, 1998). L'IL-10 réduit fortement la prolifération des cellules T humaines spécifiques aux antigènes en diminuant la capacité de la présentation d'antigène des monocytes par la régulation à la baisse de l'expression du CMH-II (De Wall *et al.*, 1991). De plus, elle inhibe la production des cytokines par les macrophages activés, par exemple l'expression induite par le LPS de l'IL-1 α , de l'IL-6 ou du TNF- α est inhibée (Fiorentino *et al.*, 1991). L'IL-10 ne joue pas seulement un rôle dans la régulation de l'activation des cellules T, mais aussi dans la régulation à la baisse de la réponse inflammatoire aigue. Plusieurs recherches sur les MII se concentrent sur les propriétés anti-inflammatoires de l'IL-10 (revue dans Rogler et Andus, 1998). Le rôle important de l'IL-10 dans l'homéostasie immune intestinale a été démontré par l'utilisation de souris déficientes en IL-10, qui développent automatiquement une entéocolite intestinale qui peut être prévenue par l'administration d'IL-10 (Kühn *et al.*, 1993). La diminution de l'activation des phagocytes mononucléaires impliqués dans les MII par l'IL-10 a aussi été démontrée (Schreiber *et al.*, 1993).

1.5.5 Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α)

Le TNF- α est un important médiateur de l'inflammation. Il partage plusieurs activités pro-inflammatoires avec l'IL-1. Le système du TNF- α est complexe, semblable à celui de l'IL-1, et il possède aussi des mécanismes similaires de régulation. Contrairement à l'IL-1, les études sur l'expression du TNF- α dans les MII sont parfois contradictoires (revue dans Rogler et Andus, 1998). Selon les recherches, certains groupes démontrent des niveaux augmentés de TNF- α (Maheda *et al.*, 1992; Braegger *et al.*, 1992; Andus *et al.*, 1993), alors que pour d'autres il est impossible de détecter une augmentation de l'expression du TNF- α chez les patients atteints de MII (Youngman *et al.*, 1993).

1.5.6 La prostaglandine E2

La PGE2 est une des plus importants prostanoïdes (prostaglandines) biologiquement actifs retrouvés dans l'intestin. Malgré le fait que la PGE2 régule plusieurs fonctions physiologiques de l'intestin, incluant la protection de la muqueuse, les sécrétions gastro-intestinales et la motilité, elle est aussi impliquée dans la physiopathologie des MII et de la néoplasie colorectale (revue dans Dey *et al.*, 2006). La PGE2 est impliquée dans les processus de fièvre, de la douleur, de l'oedème et de l'inflammation (Cheon *et al.*, 2006). Les fonctions biologiques variées exercées par la PGE2 passent principalement via des récepteurs membranaires spécifiques couplés à la protéine G, nommés récepteurs EP, soit les EP1, EP2, EP3 et EP4 (revue dans Dey *et al.*, 2006). L'affinité de ces récepteurs varie selon le récepteur, mais aussi selon les espèces. Ces récepteurs se présentent sous plusieurs isoformes différents. Les récepteur EP3 et EP4 ont la plus grande affinité pour la PGE2 que les récepteurs EP2 et EP1, qui possède l'affinité la plus faible (revue dans Dey *et al.*, 2006). La PGE2 est synthétisée à partir de l'acide arachidonique (Calder, 2001). Toutes les prostaglandines partagent un mécanisme de biosynthèse qui commence par l'hydrolyse des phospholipides de la membrane cellulaire, médiée par l'enzyme phospholipase A2 (PLA2) (Murakami *et al.*, 1997, 2002). L'acide arachidonique est transformé en PGE2 par l'action des enzymes appelées COX (Hamberg *et al.*, 1974), dont trois isoformes différents ont été identifiés. La COX-1 exprimée de façon constitutive et la COX-2, exprimée de façon inductible, sont les

deux plus importantes isoformes (Smith *et al.*, 1994, 1996). La COX-3 est une variante de la COX-1 et est retrouvée seulement dans le cœur et dans le cerveau (Chandrasekharan *et al.*, 2002). La PGE2 est relâchée à l'extérieur de la cellule immédiatement après sa synthèse et exerce son action par les récepteurs EP1 et EP2 de façon autocrine ou paracrine (Narumiya, 1994). Il a été démontré que la PGE2 régule la production de plusieurs cytokines. La PGE2 augmente les niveaux d'IL-6 et d'IL-10 produits par les macrophages activés selon des mécanismes différents. La synthèse d'IL-10 en réponse à la PGE2 dépend de l'activité de la voie p38 MAP kinase, tandis que celle de l'IL-6 n'en dépend pas (Gomi *et al.*, 2000). Il a aussi été démontré que la présence de PGE2 augmente l'effet d'activation de l'IL-10 sur les voies de signalisation qu'elle induit (STAT1, STAT3) (Cheon *et al.*, 2006).

1.5.7 L'interleukine-17

L'IL-17 est une cytokine inflammatoire majoritairement exprimée par les cellules T CD4+, maintenant appelées cellules T-helper 17 ou Th17. Il est maintenant reconnu que l'IL-17 est impliquée dans la plupart des maladies auto-immunitaires, telles que les MII. L'IL-17 a initialement été découverte par Golstein et son équipe (Rouvier *et al.*, 1993). La forme la plus commune d'IL-17 est l'IL-17A (Yao *et al.*, 1995; Aggarwal *et al.*, 2002). Les membres de la famille de l'IL-17 effectuent leur signalisation par le récepteur IL-17 (Yao *et al.*, 1995), un récepteur protéique transmembranaire de type I qui est exprimé dans plusieurs tissus. L'IL-17 active les trois classes de MAP kinases, incluant ERK1/ERK2, JNK et p38 (Laan *et al.*, 2001; Spriggs *et al.*, 1997; Awane *et al.*, 1999). L'activation des voies MAP kinase induites par l'IL-17 résulte en la production d'IL-6 et de la chimiokine IL-8 *in vitro*, ce qui cause un recrutement des neutrophiles dans le tissu local (Laan *et al.*, 1999; Hata *et al.*, 2002). Cette cytokine déclenche aussi la cascade de signalisation associée au facteur NF- κ B, ce qui mène à la prolifération des cellules T et à l'augmentation de plusieurs cytokines inflammatoires, de la synthèse inductible de l'oxyde nitrique et de l'IL-1 β (Nakae *et al.*, 2002; Schwarzenberger *et al.*, 2000). Il a été démontré que le niveau d'IL-17 est augmenté dans une variété de maladies inflammatoires incluant l'arthrite rhumatoïde (Chabaud *et al.*, 1999; Lubberts *et al.*, 2001), la pneumonie bactérienne (Ye *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2001), l'asthme (Molet *et al.*, 2001; Linden *et al.*, 2001), l'encéphalopathie auto-immune expérimentale

(Harrington *et al.*, 2005; Lock *et al.*, 2002) et récemment dans les MII (Fujino *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005). De plus, l'IL-17 semble induire de façon synergique l'expression de la COX-2 et de l'IL-6 dans les myofibroblastes intestinaux humains (Zhang *et al.*, 2006; Andoh *et al.*, 2002). Cet effet de l'IL-17 est médié par le facteur NF- κ B et par les voies MAP kinases (Hata *et al.*, 2002). Plusieurs résultats obtenus lors d'expériences sur l'implication de l'IL-17 dans les maladies inflammatoires suggèrent que l'IL-17 est initialement impliquée dans la réponse immune innée. En plus de son effet sur l'immunité innée, il a été démontré que l'IL-17 joue un rôle dans les réponses immunes adaptatives induites par les antigènes (Hellings *et al.*, 2003).

1.5.8 L'interleukine-23

L'IL-23 est une nouvelle cytokine hétérodimérique qui appartient à la famille de l'IL-12, qui comprend les molécules nécessaires à l'initiation effective de la réponse de cellules T. L'IL-23 consiste en une sous-unité hélicoïdale p19 et la sous-unité commune p40 (Oppmann *et al.*, 2000). La sous-unité p40 associée à la sous-unité p35 forme l'IL-12. Similaire à l'IL-12, l'IL-23 est principalement produite par les cellules myéloïdes activées telles que les macrophages et les cellules dendritiques (Oppmann *et al.*, 2000). Initialement, plusieurs pensaient que la fonction de l'IL-23 était similaire à celle de l'IL-12. Cependant, la déficience en IL-12p40 et en IL-23p19 élimine complètement la production d'IL-17 et prévient les maladies auto-immunes, alors que la délétion de la sous-unité IL-12p35, qui résulte en une IL-12 défectueuse, montre beaucoup moins d'effet sur la réponse auto-immune (Cooper *et al.*, 2002; Camoglio *et al.*, 2002). Ces faits suggèrent que l'IL-23 serait majoritairement responsable, beaucoup plus que l'IL-12, de plusieurs réponses immunopathologiques. La population cellulaire cible de l'IL-23 est un sous-groupe de cellules CD4⁺ (Oppmann *et al.*, 2000) suite à l'activation de son récepteur, constitué d'IL-23R et de IL-12R β 1 (Parham *et al.*, 2002). L'IL-23 active les facteurs STAT3 et STAT4 et permet la différenciation des lymphocytes CD4⁺ sensibles en une sous-population pathogénique caractérisée par la capacité de produire de l'IL-17, les cellules Th17 (Oppmann *et al.*, 2000; Parham *et al.*, 2002; Langrish *et al.*, 2005; Langrish *et al.*, 2004; Aggarwal *et al.*, 2003). En absence d'IL-4 et d'IFN- γ , plus de cellules Th17 seront générées car l'IFN- γ et l'IL-4 peuvent agir comme

inhibiteurs de la génération des cellules Th17. Il est important de noter que le récepteur à l'IL-23 (IL-23R) est absent des cellules T naïves et qu'il y a d'autres facteurs impliqués dans la génération des cellules Th17. Récemment, il a été démontré que le TGF- β et l'IL-6 occupent ce rôle en augmentant l'apparition de l'IL-23R à la surface des cellules T naïves (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que le TGF- β , une molécule bien connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, est impliqué dans l'apparition de ces cellules. L'équipe de Sutton *et al.*, (2006) a démontré que l'IL-1 α et l'IL-1 β sont nécessaires à l'expression de l'IL-17 médiée par l'IL-23. De plus, le TNF- α induit un effet synergique sur la production de l'IL-17 par l'IL-23. Plusieurs études suggèrent que l'IL-6 et le TGF- β permettent l'initiation et la différenciation des cellules T naïves en cellules Th17 alors que l'IL-23 sert plutôt à maintenir la population de cellules Th17, à assurer leur survie à long terme, ainsi qu'à induire la production d'IL-17 chez les cellules T mémoire Th17.

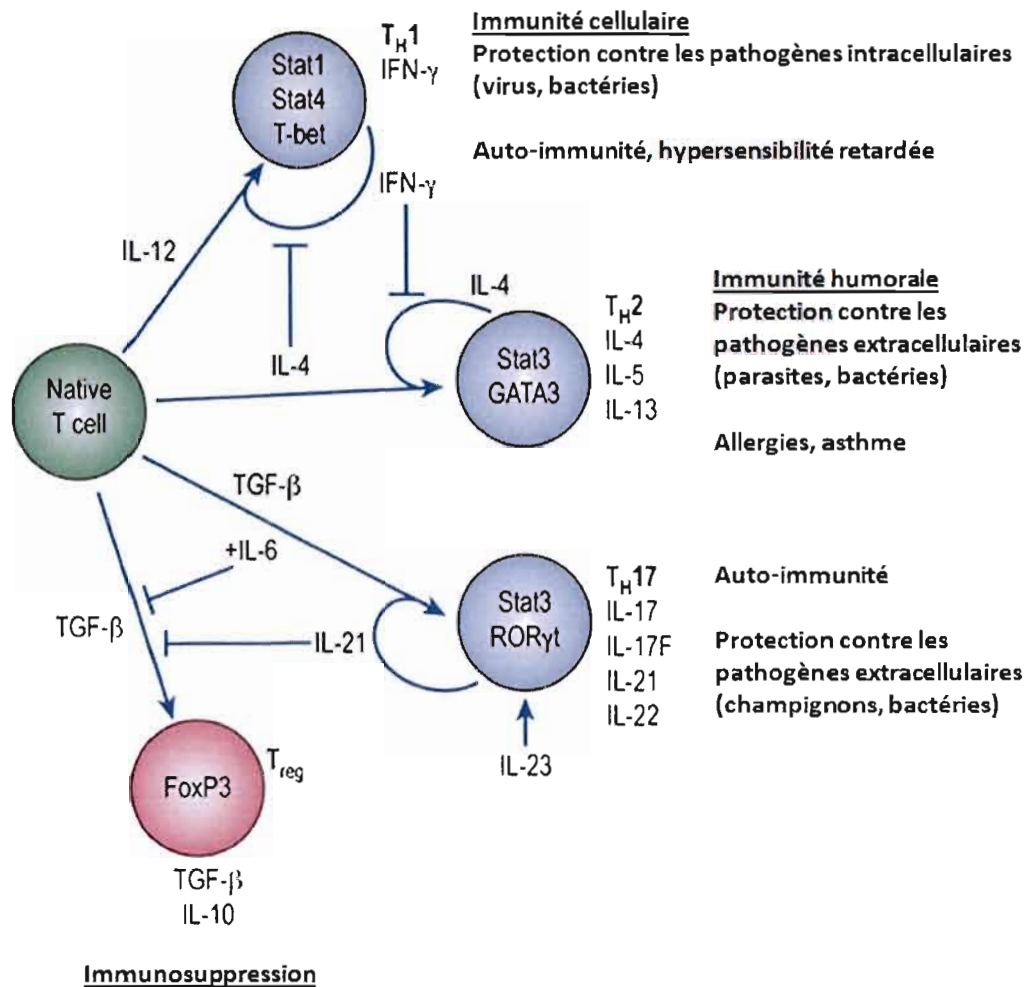


Figure 1.2: Modèle de différenciation des lymphocytes dans le tissu intestinal. Les lymphocytes naïfs se différencient en lymphocytes Th1, Th2, Th17 et Treg sous l'effet des différentes cytokines et molécules présentes dans leur environnement (Modifiée de Deenick *et al.*, 2007).

1.6 Modèles animaux de maladies inflammatoires intestinales

1.6.1 Les modèles animaux de colite inflammatoire

Les modèles murins sont devenus essentiels pour déterminer les mécanismes physiopathologiques et les processus immunologiques à l'origine de l'inflammation chronique des muqueuses, incluant le modèle au sulfate de sodium dextran (DSS) et le modèle à l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS). Le modèle animal à considérer doit être choisi selon les aspects de la maladie humaine à laquelle il doit ressembler (Axelsson *et al.*, 1996). Le critère de base pour un modèle expérimental animal idéal des maladies intestinales inflammatoires humaines, est que le modèle présente toutes les caractéristiques de la maladie humaine.

Nous pouvons nous interroger sur cette similitude, car certains sont plus ou moins d'accord avec l'affirmation que le modèle DSS doit être associée à la colite ulcéreuse, et le modèle TNBS avec la maladie de Crohn. Il semble que ces modèles présentent des similitudes avec les MII, souvent en relation avec la variation du profil des cytokines et l'implication de facteurs spécifiques. La maladie de Crohn quant à elle peut atteindre l'ensemble du tube digestif, mais le modèle au TNBS associé ne peut provoquer l'inflammation qu'au niveau du gros intestin. Le mode d'administration de ces deux produits par voie orale pour le DSS et rectale pour le TNBS entraîne aussi des différences dans les lésions par rapport à ce qui est observée dans les MII humaines (Axelsson *et al.*, 1996). Ces modèles murins d'inflammation intestinale induite chimiquement sont les plus utilisés et les mieux connus. Premièrement, l'initiation et la durée de l'inflammation est quasi immédiate et contrôlable. Ensuite, ces modèles n'impliquent pas de délétions artificielles de gènes ou des manipulations qui ne sont pas retrouvés dans les MII chez l'humain (Strober *et al.*, 2002; Wirtz *et al.*, 2007). De plus, ces modèles de colite chimique ont démontré être semblables aux MII humaines sous de multiples aspects, incluant la dérégulation des principales cytokines impliquées (Mizoguchi *et al.*, 2008).

Donc, ces modèles sont des outils utiles pour étudier les médiateurs de la réponse innée, adaptative ainsi que les mécanismes de régulation de l'immunité intestinale (Strober *et al.*, 2002; Wirtz *et al.*, 2007). Il est important de noter que même si la similarité de ces modèles chimiques aux MII humaines a été largement démontrée, leur degré réel d'équivalence par rapport à la maladie de Crohn et à la colite ulcéreuse humaines demeure incertain (Okayasu *et al.*, 1990; Carvalho *et al.*, 2008; Deger *et al.*, 2006).

1.6.2 Les modèles de la colite induite par le DSS et le TNBS

La colite expérimentale provoquée par le DSS chez les rongeurs a été introduit par Okayasu *et al.* (1990). C'est un modèle reconnu d'inflammation intestinale qui est similaire aux maladies inflammatoires chroniques humaines comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Dans ce modèle, le DSS administré oralement, est utilisé pour provoquer une colite chez la souris, ou chez d'autres rongeurs comme chez le rat (Kimura *et al.*, 1995; Kishimoto *et al.*, 1992) ou le hamster (Ohkusa *et al.*, 1985; Yamada *et al.*, 1992)

La colite induite au DSS montre plusieurs des caractéristiques inflammatoires cliniques et histopathologiques retrouvées chez les humains avec une colite ulcéreuse (Hamilton *et al.*, 1983; Jewell *et al.*, 1992; Morson *et al.*, 1988; Price *et al.*, 1992). En effet, l'inflammation du côlon induite au DSS commence dans le côlon distal et progresse pour atteindre tout le côlon et dans les cas sévère le caecum (Axelsson *et al.*, 1996). De plus, l'inflammation est confinée à la muqueuse et n'est généralement pas transmurale (Okayasu *et al.*, 1990; Cooper *et al.*, 1993; Murthy *et al.*, 1993)

L'inflammation induite au DSS ne dépend pas de la présence d'aucune espèce bactérienne spécifique de la flore (Bylund-Fellenius *et al.*, 1993; Axelsson *et al.*, 1996). Cependant, comme pour les maladies intestinales inflammatoires humaines (Hamilton *et al.*, 1983; Murthy *et al.*, 1994), la pathogénèse exacte de la colite induite au DSS demeure inconnue (Okayasu *et al.*, 1990; Ohkusa, 1985; Cooper *et al.*, 1993; Axelsson *et al.*, 1993; Axelsson, 1996). Le mécanisme d'action du DSS n'est cependant pas totalement inconnu, l'importance des groupements sulfates a été démontrée dans l'initiation des mécanismes

d'inflammation (Elson *et al.*, 1995). Malgré son poids moléculaire important, le DSS peut pénétrer par pinocytose à l'intérieur des cellules de la muqueuse et donc pourrait directement jouer un rôle dans l'oxydation de l'ADN (Kitajima *et al.*, 1999) Le degré d'inflammation de la colite induite au DSS dépend du poids moléculaire et du niveau de sulphatation du DSS, ainsi que du dosage et de la durée de la période d'administration (Okayasu *et al.*, 1990; Yamada *et al.*, 1992; Axelsson *et al.*, 1998; Bylund-Fellenius *et al.*, 1993; Cooper *et al.*, 1993; Murthy *et al.*, 1993).

Pour déterminer la pertinence et l'exactitude du modèle de colite induite au DSS, l'inflammation induite doit répondre au traitement avec des médicaments généralement acceptés et utilisés pour le traitement des MII chez l'humain (Axelsson *et al.*, 1993). L'inflammation induite au DSS semble réduite avec certains traitements expérimentaux, comme avec le composé antioxydant MDL73404, et l'immunosuppresseur FK506 (Murthy *et al.*, 1994; Takizawa *et al.*, 1995). L'inflammation induite par le DSS répond aussi au traitement à la cyclosporine, un médicament immunosuppresseur utilisé pour traiter les MII chez l'humain (Murthy *et al.*, 1993), mais aucune réponse positive au traitement à la sulphasalazine chez le rat en inflammation intestinale n'a été observée (Chen *et al.*, 1995).

Chez la souris, un autre modèle clairement établi de maladie inflammatoire intestinale induite chimiquement est la colite causée par l'administration de TNBS. Le TNBS est un haptène qui, lorsqu'il est administré par voie intrarectale induit une inflammation transmurale sévère du côlon ayant certaines similitudes avec la maladie de Crohn (Strober *et al.*, 2002; te Velde *et al.*, 2006). Les modèles DSS et TNBS sont bien établis et utilisés depuis plus de 20 ans dans l'étude des MII (Strober *et al.*, 2002). L'espèce de souris C57BL/6 est hautement susceptible à la colite au DSS, mais est relativement résistante à la colite induite au TNBS. Les souris C57BL/6 sont généralement utilisées pour les études impliquant le DSS, tandis que les souris BALB/c sont plutôt utilisées lors des études avec colite induite au TNBS (te Velde *et al.*, 2006). L'administration orale de DSS pendant 5 à 7 jours ou l'administration intra rectale de TNBS pendant 3-5 jours, sont amplement suffisantes pour induire une inflammation aigue intestinale chez les souris. La durée et la gravité des lésions varient selon la dose et la concentration des produits. La progression de la colite dans ces deux modèles est

caractérisée par une perte de poids, un ramollissement des fèces et diarrhée, la présence de sang dans les fèces. L'examen morphologique révèle généralement une réduction de la longueur du côlon, un épaissement de sa paroi et la présence de fèces contenant du sang (Alex *et al.*, 2009).

L'administration orale de DSS en 4 cycles et l'administration intra rectale hebdomadaire de TNBS pendant 5 semaines induit l'inflammation chronique du côlon, respectivement chez les souris C57BL/6 et BALB/c. La colite chronique au DSS est caractérisée par une réduction marquée de la longueur du côlon, d'importants saignements et une ulcération, tandis que la colite chronique au TNBS montre aussi un épaissement important de la paroi et parfois des adhésions et de la fibrose, mis en évidence par un indice d'activité élevé (Alex *et al.*, 2009).

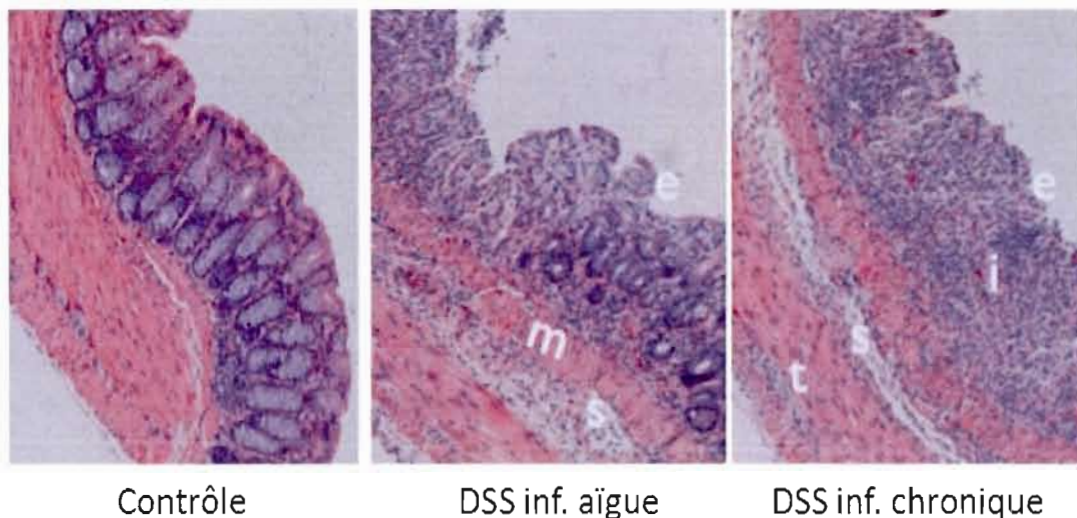


Figure 1.3: Analyse histologique de côlon de souris en inflammation. Les coupes présentées proviennent de tissus colorés H&E de côlon de souris contrôle, avec colite aigue induite au DSS et avec colite chronique induite au DSS. *e* : atteinte et désorganisation de l'épithélium; *i* : infiltrat inflammatoire; *m* : lamina muscularis mucosae; *s* : oedème submucosal; *t* : épaissement musculaire dans la lamina muscularis propria. Grossissement : 20X (Tirée de Alex *et al.*, 2009).

Au niveau histologique, la colite aigue au DSS est caractérisée par des lésions aux cryptes focales, une diminution des cellules de Goblet et une infiltration de cellules inflammatoires au niveau des lésions. La colite aigue au TNBS est caractérisée par une perte de l'architecture au niveau de la membrane et une infiltration transmembranaire de cellules immunes étendue à la muqueuse et à la sous muqueuse (Alex *et al.*, 2009). La colite chronique induite au DSS est caractérisée par un dérangement architectural, une nécrose épithéliale, des abcès cryptiques et une infiltration diffuse de lymphocytes. La colite chronique induite au TNBS est caractérisée par un œdème sous-mucosal généralisé, une nécrose de la muqueuse et une infiltration importante de cellules inflammatoires. L'indice d'activité histopathologique, qui prend en considération les dommages à la membrane épithéliale et le niveau d'infiltration de cellules inflammatoires, est élevé de façon significative autant dans les modèles chroniques et aigus de colite induite au DSS que ceux provoqués par le TNBS (Alex *et al.*, 2009). L'infiltration de neutrophiles, mise en évidence par l'augmentation de l'activité des myéloperoxidases (MPO), est aussi élevée de façon significative autant dans les modèles chroniques et aigus de colite induite par le DSS ou par le TNBS.

Comme rapporté dans les études de Xavier *et al.*, (2007) et Wirtz *et al.*, (2007), les caractéristiques cliniques et histopathologiques de la colite au DSS sont semblables à celles de la colite ulcéraire (dégradation de l'épithélium, lésions focales et inflammation superficielle) et celles de la colite au TNBS se comparent aux lésions observées dans la maladie de Crohn (associées à une inflammation transmurale et de l'œdème).

1.6.3 Le modèle de la souris knock-out IL-10

Le modèle de la souris knockout pour le gène de l'IL-10 (IL10^{-/-}) est aussi un modèle fréquemment utilisé pour étudier l'inflammation intestinale. Ces souris développent une colite chronique inégale semblable à la maladie de Crohn (Kuhn *et al.*, 1993). Ce modèle comporte deux caractéristiques importantes. Premièrement la perméabilité du petit intestin augmente graduellement chez ces souris, du début de leur vie jusqu'à la mise en place de la maladie (Madsen *et al.*, 2001). En second lieu, le développement de la maladie dépend de la présence

des facteurs luminaux, ce qui veut dire que la maladie ne se développe pas dans des conditions aseptiques. Ces observations suggèrent que la colite observée chez ces animaux peut se développer comme étant une conséquence de la perméabilité anormale du petit intestin couplée à une augmentation de la présentation d'antigènes luminaux au système immunitaire mucosal (Arrieta *et al.*, 2005).

1.7 Les lactobacilles et l'immunité

1.7.1 Les probiotiques

Le terme "probiotique" est dérivé des racines grecques pro et biota qui signifient "pour la vie" (Reid *et al.*, 2003). Le FAO (Food and Agriculture Organization) et le WHO (World Health Organization) ont défini les substances probiotiques comme des 'microorganismes vivants', qui, administrés en quantité adéquate, confère à l'hôte des effets bénéfiques sur sa santé (FAO et WHO, 2002). Une variété de genre de bactéries sont utilisées comme probiotiques, dans des préparations alimentaires. Les genres les plus utilisés sont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus* et *Streptococcus*. Certains champignons et levures sont aussi utilisés comme probiotiques telles que *Saccharomyces* (Jin *et al.*, 2005; Gibson *et al.*, 1995; Alvarez-Olmos *et al.*, 2001).

Pour être considérés comme des probiotiques, les microorganismes doivent rencontrer quelques critères spécifiques. Le microorganisme probiotique idéal doit avoir une très grande viabilité cellulaire et doit être capable de résister aux acides et de survivre à pH très bas (Reid *et al.*, 2003). Ce microorganisme doit aussi avoir la capacité de persister dans l'intestin même s'il ne peut coloniser l'ensemble du tractus digestif (Harmsen *et al.*, 2000). L'adhésion à l'épithélium intestinal est nécessaire pour annuler l'effet d'expulsion causé par le péristaltisme. Ils doivent aussi être capables d'interagir ou d'envoyer des signaux aux cellules immunes associées au tractus intestinal (Kopp-Hoolohan *et al.*, 2001). Ces microorganismes doivent être non pathogènes pour l'humain. Ils doivent résister aux processus enzymatiques de la digestion intestinale mais aussi avoir la capacité d'influencer l'activité métabolique locale ou systémique (Harmsen *et al.*, 2000). Il a aussi été démontré que les effets des

probiotiques peuvent être synergiquement augmentés en présence de certaines substances, tels l'inuline ou des fructo-oligosaccharides, qui sont des substances appelées prébiotiques (Kopp-Hoolohan *et al.*, 2001). Parmi les espèces bactériennes pouvant exprimer des propriétés probiotiques, les bactéries du genre *Lactobacillus* sont particulièrement intéressantes.

1.7.2 Caractéristiques des lactobacilles

Les Lactobacilles font partie des bactéries lactiques (LAB), un groupe bactérien caractérisé par le fait que ses membres produisent de l'acide lactique comme seul ou majeur produit final du métabolisme des carbohydrates (revue dans Tannock, 2004). Les bactéries du genre *Lactobacillus* sont des bactéries Gram positif, immobiles, anaérobies facultatives, non-sporulantes, en forme de bâtonnet ou de coccobacille avec un contenu en G+C de l'ADN généralement inférieur à 50 mol% (Hammes *et al.*, 1995). Elles ont des besoins nutritionnels complexes : carbohydrates, acides aminés, peptides, esters d'acides gras, sels, dérivés d'acides nucléiques et vitamines (revue dans Tannock, 2004).

La plupart des lactobacilles présentent une caractéristique propre dans le sens qu'elles opèrent en se servant du métabolisme homofermentatif (c'est-à-dire qu'elles ne produisent que de l'acide lactique à partir des sucres), et qu'elles sont aérotolérantes en dépit de l'absence complète d'une chaîne respiratoire. Cette aérotolérance est dépendante du manganèse et a été étudiée dans le cas du *Lactobacillus plantarum*. Utilisant le glucose comme source de carbone, les lactobacilles peuvent être homofermentatives (produisant plus de 85% de produits de fermentation comme l'acide lactique) ou hétérofermentatives en produisant de l'acide lactique, du dioxyde de carbone, de l'éthanol, et/ou acide acétique en quantités équimolaires (revue dans Tannock, 2004). Leurs besoins nutritionnels sont adaptés à leur habitat riche en substrats contenant du carbone. Ainsi, les LAB sont retrouvées sur les plantes ou sur du matériel d'origine végétal, dans la nourriture fermentée ou avariée, ou en association avec les animaux (Hammes *et al.*, 1995).

Aujourd'hui, vingt-cinq espèces de lactobacilles ont été identifiées (Satokari *et al.*, 2003; Klaenhammer *et al.*, 2008). Le génome de plusieurs membres de ce genre a déjà été séquencé. Chez l'humain et chez les animaux, les lactobacilles sont des bactéries commensales faisant partie de la flore normale et sont généralement utiles, voire nécessaires. On les retrouve dans le tractus vaginal et le tractus gastro-intestinal et ils constituent un élément important de la flore intestinale. Beaucoup d'espèces jouent un grand rôle dans la décomposition de la matière végétale. La production d'acide lactique acidifie l'environnement, ce qui inhibe la croissance de certaines bactéries nocives. Les lactobacilles n'exercent aucun rôle pathogène. Dans la cavité orale et dans l'intestin, *Lactobacillus acidophilus* est l'espèce la plus fréquemment retrouvée (Klaenhammer *et al.*, 2008). Au niveau vaginal, le bacille de Döderlein qui y maintient un pH acide par la production d'acide lactique à partir du glycogène présent dans le mucus vaginal empêche l'invasion d'autres espèces bactériennes éventuellement nocives (Klaenhammer *et al.*, 2008; Reid *et al.*, 2003).

1.7.3 Utilisation des lactobacilles dans l'industrie alimentaire

L'utilisation des lactobacilles dans l'industrie alimentaire a une très longue histoire et les fonctions des bactéries utilisées dans un contexte industriel ont été bien étudiées (Jay *et al.*, 1996). Les lactobacilles sont importants dans la production de nourriture qui requière une fermentation lactique, comme les produits laitiers yogourt et fromage, les légumes fermentés comme les olives, les cornichons et la choucroute, les viandes fermentées telles le salami, ainsi que l'ensilage, le foin fermenté donné comme nourriture aux animaux de ferme (revue dans Tannock, 2004; Jay *et al.*, 1996). Le genre *Lactobacillus*, le plus étudié des probiotiques, est communément utilisé dans les processus de fermentation du lait (Ouwehand *et al.*, 2003), tel que lors de la fabrication du beurre, du fromage, ou des préparation de type yogourt, kéfir etc. Le pain au levain est aussi fabriqué en utilisant une culture de départ qui est une co-culture symbiotique de levures et de bactéries lactiques cultivées dans un milieu constitué de farine et d'eau (revue dans Tannock, 2004). Quelques boissons au yaourt contiennent des lactobacilles comme complément alimentaire. Le kimchi coréen est également fabriqué en utilisant des techniques de fermentation par l'acide lactique. Beaucoup de lactobacilles ont ce caractère exceptionnel parmi les êtres vivants qu'ils n'exigent pas de

fer pour leur croissance et qu'ils ont une tolérance très haute envers l'eau oxygénée (revue dans Tannock, 2004). Certains lactobacilles, particulièrement *L. casei* et *L. brevis*, sont parmi les plus communs des organismes qui altèrent la bière. Cependant, les lactobacilles qui ne colonisent pas les corps des animaux sont beaucoup moins connus malgré un intérêt continue de la part des scientifiques depuis maintenant presque plus de 100 ans (revue dans Tannock, 2004).

1.7.4 Effets immunomodulateurs induits par des lactobacilles

Certaines bactéries lactiques, pouvant être reconnues comme probiotiques, semblent posséder des propriétés immunomodulatrices. Les effets des lactobacilles dépendent directement de la souche. Plusieurs souches de *Lactobacillus* agissent sur les plaques de Peyer pour stimuler la production des IgA sécrétoires et aider à la phagocytose, démontrent une action anti-inflammatoire par la régulation de la production des cytokines et possèdent un potentiel antiallergique par la réduction de la production des IgE (Clancy *et al.*, 2003; Erickson *et al.*, 2000; Kitazawa *et al.*, 2003; Chapat *et al.*, 2004). Les lactobacilles augmentent la production d'une large variété de cytokines dépendamment de la souche utilisée. Certaines souches augmentent les cytokines associées au profil Th1, soit des cytokines produites par les lymphocytes T helper pro-inflammatoires producteurs d'IFN- γ , et d'autres souches augmentent les cytokines associées au profil Th2, cytokines produites par les lymphocytes T helper qui stimulent la production d'anticorps par la sécrétion d'IL-4 et de TGF- β (Cross *et al.*, 2002).

1.7.5 Rôles des lactobacilles dans les fonctions immunitaires intestinales

Depuis que certaines souches de Lactobacilles sont reconnues comme bactéries à vocation potentiellement probiotiques, plusieurs études ont été orientées sur l'identification des substances et des bactéries pouvant réguler les cytokines intestinales ainsi que les mécanismes responsables de leurs propriétés anti-inflammatoires. La recherche sur les lactobacilles a permis de constater que l'ingestion par voie orale de *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* ou *L. casei* stimule la production et l'activité des lymphocytes suite à

l'augmentation des cytokines macrophagiques (IL-6, IL-10, IL-12), des interférons α et β (IFN- α , IFN- β) et du NO (Kato *et al.*, 1998 ; Tejada-Simon *et al.*, 1999; Kitawaza *et al.*, 1993; Hessle *et al.*, 1999). Par contre, l'ingestion de *L. acidophilus* ou *L. casei* semble augmenter le nombre de cellules productrices d'IgA et/ou de lymphocytes B spléniques (Perdigon *et al.*, 1995; Pestka *et al.*, 2001) et *L. paracasei* a plutôt stimulé la production de lymphocytes T CD4⁺ régulateurs ayant une faible capacité proliférative et une forte production de cytokines suppressives, telles que l'IL-10 et le TGF- β (Weid *et al.*, 2001). Il semble de plus en plus admis que les types de cytokines produites et leur quantité relative varie selon la souche de lactobacilles, mais les mécanismes impliqués ne sont pas connus. Par contre, les souches de Lactobacilles couramment utilisées dans l'industrie alimentaire ne semblent pas capables d'induire la production de cytokines par les cellules immunes intestinales (Maassen *et al.*, 2000). D'autre part, Haller *et al.* (2002) ont démontré que les lactobacilles stimulaient les macrophages à produire de l'IL-10, ce qui contrebalance les effets pro-inflammatoires des lymphocytes. L'administration intragastrique de la bactérie *L. lactis* génétiquement modifiée pour sécréter de l'IL-10 a diminué de 50% les lésions dans un modèle expérimental d'inflammation intestinale (Steidler *et al.*, 2000).

Les propriétés immunomodulatrices des lactobacilles sont reliées non seulement à la structure de leur paroi bactérienne mais aussi à des substances excrétées par la bactérie ou transformées par les enzymes bactériens. Plusieurs souches de lactobacilles produisent des exopolysaccharides (EPS), responsables de propriétés rhéologiques (Welman *et al.*, 20003). Les propriétés immunomodulatrices de ces EPS ne sont pratiquement pas connues.

Afin de comprendre le rôle des lactobacilles et/ou de leurs sous-produits, il faut se rappeler que les cellules épithéliales intestinales et les macrophages/cellules dendritiques sont les premières cellules en contact avec les bactéries intestinales et sont directement impliquées dans la régulation de l'état de tolérance/inflammation de l'intestin (Nagler-Anderson C., 2000).

1.8 Propriétés de *Lactobacillus kefiranofaciens*

L'équipe de Toba *et al.* (1986) a isolé une bactérie productrice d'EPS du kéfir qu'ils ont nommé *Lactobacillus kefiranofaciens*. *L. kefiranofaciens* est une espèce communément retrouvée parmi la microflore (microbiota) du kéfir (Farnworth *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2004).

1.8.1 Caractéristiques de *L. kefiranofaciens*

Le kéfir est un breuvage laitier fermenté produit par l'action des lactobacilles, levures et bactéries productrices d'acide acétique, prises dans une matrice complexe (les grains de kéfir) de microorganismes, d'EPS et de protéines (Farnworth *et al.*, 2003). L'effet probiotique attribué aux lactobacilles et les produits laitiers fermentés proviennent non seulement des microorganismes entiers et des composantes de leur membrane, mais aussi des métabolites tels que les peptides et les polysaccharides extracellulaires produits durant la fermentation. Les premières observations de la structure de grains de kéfir montrent que plusieurs bactéries sont encapsulées par un EPS appelé kéfiran (La Rivière *et al.*, 1967; Vinderola *et al.*, 2007). Plusieurs bactéries isolées du kéfir sont capables de produire cet hétéropolysaccharide, incluant *L. kefiranofaciens*, *L. kefirgranum*, *L. parakefir*, *L. kefir* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Farnworth *et al.*, 2003; Arihara *et al.*, 1990; Frengova *et al.*, 1993). La structure de ces EPS a été étudiée en détail, mais il y a peu d'informations sur leurs fonctions physiologiques (Nishimura-Uemura *et al.*, 2003). Il a été démontré que plusieurs EPS dérivés de ces lactobacilles possédaient une activité mitogénique sur les lymphocytes B (Kitazawa *et al.*, 1993; Kitazawa *et al.*, 1998), avaient la capacité d'induire la production de cytokines (Kitazawa *et al.*, 1999) et de modifier plusieurs fonctions des macrophages et des splénocytes (Kitazawa *et al.*, 2000; Kitazawa *et al.*, 2004). Il y a plusieurs articles qui rapportent aussi les propriétés antimicrobiennes et cicatrisantes du kéfiran (Santos *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005), sa capacité à abaisser la pression sanguine et le cholestérol dans le sérum (Maeda *et al.*, 2004; Maeda *et al.*, 2004) ainsi que sa capacité à retarder la croissance tumorale dans quelques modèles expérimentaux (Shiomi *et al.*, 1982; Murofushi *et al.*, 1986; Furukawa *et al.*, 1991; Furukawa *et al.*, 2000). L'analyse détaillée par résonance magnétique nucléaire a

montré que l'EPS soluble dans l'eau consiste en un arrangement de glucose et de galactose dans des rapports approximativement égaux (Vinderola *et al.*, 2007).

1.8.2 Propriétés immunologiques des composantes de *L. kefiranofaciens*

L'équipe de Vinderola (2005) a récemment démontré la capacité immunomodulatrice du kéfir dans des modèles murins, montrant l'importance de la concentration et de la viabilité cellulaire des bactéries pour obtenir une réponse de type Th1 ou Th2. Ils ont aussi observé les effets de la microflore du kéfir ainsi que de la fraction non bactérienne sur la production des cytokines par les cellules des populations immunitaires adhérentes des plaques de Peyer et les macrophages péritonéaux (Vinderola *et al.*, 2006). Il a été démontré que le kéfir pouvait moduler la réponse immune chez les souris, augmentant le nombre de cellules IgA+ dans la muqueuse de l'intestin et dans les bronches ainsi que l'activité phagocytaire des macrophages péritonéaux et pulmonaires (Vinderola *et al.*, 2006). Le but de l'étude de Vinderola *et al.* (2006) était aussi de caractériser la capacité immunomodulatrice des deux fractions du kéfir, la fraction F1, correspondant à la partie solide incluant les bactéries, et la fraction F2, étant le liquide résiduel, en étudiant les cytokines TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-10 mais aussi l'IFN- γ , produites par les macrophages péritonéaux et les cellules adhérentes des plaques de Peyer chez des souris après l'administration des différentes fractions (Vinderola *et al.*, 2006). Les deux fractions du kéfir ont induit un profil de cytokines similaire chez les macrophages péritonéaux, avec l'augmentation de la production de TNF- α et d'IL-6. La production de toutes les cytokines a été augmentée chez les cellules adhérentes des plaques de Peyer après l'administration des fractions F1 et F2, excepté pour l'IFN- γ qui a été augmenté seulement après l'administration de la fraction F2. De plus, le pourcentage de cellules IL-10+ induites par la fraction F2 chez les cellules adhérentes des plaques de Peyer est significativement plus élevé que celles induites par la F1. Les différents composants du kéfir peuvent aussi avoir un rôle de substances orales biothérapeutiques *in vivo* capables de stimuler les cellules immunes du système inné, pour réguler à la baisse le phénotype Th2 ou augmenter les réponses immunes à médiation cellulaire contre les tumeurs et les infections par des pathogènes intracellulaires (Vinderola *et al.*, 2006).

Le kéfir a aussi montré une capacité à augmenter l'activité phagocytaire des macrophages péritonéaux et pulmonaires et à moduler la réponse humorale de la muqueuse à des sites distants (Vinderola *et al.*, 2005). Par contre, les polysaccharides ont longtemps été considérés comme des antigènes indépendants des cellules T qui échouaient à induire une mémoire immunologique et la commutation de classe des immunoglobulines (Cobb *et al.*, 2005). La théorie actuelle soutient que les antigènes indépendants des cellules T se lient aux cellules B spécifiques aux polysaccharides et stimulent la production d'anticorps spécifiques sans le recrutement et l'aide des cellules T ou l'induction de la mémoire immunologique (Kalka-Moll *et al.*, 2002).

1.8.3 Effets de *L. kefiranofaciens* sur l'immunité intestinale

Dans leur travail, l'équipe de Vinderola (2007) a démontré que l'administration orale de kéfir provenant de *L. kefiranofaciens* à des souris, à une dose de 100 mg/kg, induisait une augmentation du nombre de cellules IgA+ dans la LP du petit et du gros intestin, sans modification du nombre de cellules IgG+ dans le petit intestin (Vinderola *et al.*, 2007). Plusieurs études ont démontré une augmentation de la production d'anticorps à un niveau systémique suite à l'administration orale d'EPS (Willers *et al.*, 1995; Lesinski *et al.*, 2001). Ainsi, plusieurs cellules productrices de cytokines ont été augmentées dans le petit intestin suite à l'administration de kéfir. Le nombre de cellules produisant les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-12 ont augmenté aux jours 5 et 7 après son administration. Il est connu que les macrophages et les cellules dendritiques de la LP, parmi les autres types cellulaires, produisent ces cytokines. Ils peuvent être la source de l'augmentation de l'IL-6 et l'IL-12 dans la LP du petit intestin (Husband *et al.*, 1999). D'autre part, l'augmentation du nombre des cellules Tregs productrices d'IL-10 au jour 7 après l'administration de kéfir peut favoriser le contrôle de l'homéostasie intestinale.

1.9 Produits BiolActis et lactosérum

1.9.1 Observations sur les propriétés immunomodulatrices des produits BiolActis

L'équipe des Technologies BiolActis Inc. a développé au cours de dernières années une variété de produits dérivés de la fermentation du lactosérum par *L. kefiranofaciens*. Les produits de BiolActis ont l'avantage d'être naturels, de ne pas causer d'effets secondaires tout en démontrant des effets bénéfiques pour la santé comparables à certains médicaments tels que la niacine, l'hydrocortisone, l'acide 5-aminosalicylique, la lovastatine et l'ibuprofène (Beaulieu *et al.*, 2009). Le but de l'entreprise BiolActis est de développer de nouveaux produits naturels bénéfiques pour la santé dont les effets sont documentés et supportés par de fortes preuves scientifiques inspirées des standards de l'industrie pharmaceutique (Technologie BiolActis Inc., 2010).

Le processus de fabrication des matrices protéiques malléables (MPMs) produites par BiolActis est complexe et a pris plus de 10 ans de recherche avant d'être optimisé. Premièrement, le choix et l'isolation d'une souche unique de bactéries lactiques isolée des grains de kéfir et spécifiquement adaptée à croître et à se multiplier dans des substrats protéiques variés a demandé une longue mise au point. Ce lactobacille, de l'espèce *Lactobacillus kefiranofaciens*, isolée du grain de kéfir, a été sélectionné pour sa robustesse, pour ses propriétés à produire des EPS et à croître dans un substrat non supplémenté. De plus, due à la sécrétion de protéases, cette bactérie unique permet l'hydrolyse des protéines durant le processus de fermentation ce qui mène à la génération d'une nouvelle population de peptides et de polypeptides. Le résultat final, une mixture originale complexe a été identifiée sous le vocable de MPM ou aussi dénommé récemment Multi Plex Matrices par BiolActis (Technologie BiolActis Inc., 2010).

Aujourd'hui, BiolActis est le seul propriétaire d'une large banque de différents MPMs avec des caractéristiques techniques et physiologiques variées et de multiples bénéfices sur la santé. Ces produits sont le résultat de la fermentation du lactosérum par de différentes

souches de lactobacilles avec des conditions spécifiques de production (Technologie BiolActis Inc., 2010).

L'équipe de Technologie BiolActis Inc. a démontré que l'administration préventive de MPM inhibait l'infiltration des neutrophiles dans un modèle de poche d'air (air pouch), après une injection de LPS sous la peau des souris, modèle qui présente certaines similarités avec l'arthrite rhumatoïde et d'autres maladies impliquant une augmentation des neutrophiles. L'administration de MPM a causé une diminution de 50% des leucocytes au site d'inflammation ainsi qu'une réduction importante de la production d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α (Beaulieu *et al.*, 2009). L'administration de MPM chez des souris stimule le système immunitaire à augmenter sa production de neutrophiles ainsi que le niveau de glutathion (GSH) intracellulaire. De plus, l'administration de MPM ne provoque pas la production d'anticorps spécifiques contre le MPM ce qui indique l'absence de reconnaissance immune indésirables des MPMs. Avec ces propriétés le MPM représente une nourriture fonctionnelle immunomodulatrice potentielle pour le maintien d'une santé immune générale (Beaulieu *et al.*, 2007).

Les MPMs seraient capables de générer des actions multiples en modulant le système immunitaire, tel qu'observé dans un modèle de dermatite atopique (Beaulieu *et al.*, 2007). Il semble que les MPMs auraient des propriétés métaboliques variées selon les informations fournies par l'entreprise mais ces propriétés n'ont pas encore fait l'objet de publications. Les recherches récentes ont permis de démontrer que le mécanisme d'action des MPMs cible un type particulier de lymphocytes, les cellules Th17, associées au développement des maladies auto-immunes et inflammatoires ainsi qu'à l'augmentation des molécules pro-inflammatoires (Murphy *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2005; Matusevicius *et al.*, 1999; Nakae *et al.*, 2003; Technologie BiolActis Inc., 2010). La modulation de la voie immune associée aux cellules Th17 permet la régulation de différents processus métaboliques. L'équipe de Technologie BiolActis a démontré, qu'en situation d'inflammation chronique forte, l'administration de MPM diminue la population de cellules Th17. Les études récentes indiquent que les MPMs sont responsables de la diminution de la réponse granulocyte-dépendante associée à l'obésité en diminuant le recrutement des macrophages à l'intérieur du tissu adipeux. Les MPMs

réduisent aussi la production de cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-6 et le TNF- α , ce qui bloque les interactions négatives entre le tissu adipeux et les macrophages (Beaulieu *et al.*, 2007). De plus, ce processus prévient le déclenchement de la cascade du syndrome métabolique responsable du développement du diabète de type-2, de l'hypertension, de l'hyperlipidémie en inhibant la transformation du tissu adipeux (Tilg et Moschen, 2006). Il est clair qu'il y a une importante corrélation entre la modulation du système immunitaire et le contrôle métabolique telles que la gestion du poids corporel, de l'hypertension, des lipides en circulation sanguine, et du diabète. De plus, les MPMs riches en cystéine induisent la biosynthèse du GSH qui représente un composant puissant stimulant les défenses humaines contre des maladies comme le cancer et le SIDA (Technologie BiolActis Inc., 2010). Les résultats récents obtenus par BiolActis supportent le fait que la modulation du système immunitaire peut aider à restaurer l'homéostasie d'un organisme affecté par des problèmes associés à l'obésité (Technologie BiolActis Inc., 2010).

Ces découvertes ouvrent la porte au développement de produits innovateurs en relation avec les processus inflammatoires. Ainsi, prévenir la différenciation des lymphocytes T en cellules Th17 pourrait réduire fortement ou même arrêter le développement de maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques ainsi que les MII (Maladie de Crohn) et le psoriasis (Technologie BiolActis Inc., 2010).

En appliquant ses procédés de fermentation unique à un substrat de protéines de lactosérum, BiolActis a créé des produits de première classe appartenant à la famille des lactoceutiques, un nouveau terme proposé par BiolActis pour décrire ses produits (Lemieux *et al.*, 2004). Les avancées technologiques de BiolActis ont permis de concentrer et de mettre en synergie les composés actifs biologiques du lactosérum fermenté dans une seule matrice. Les produits développés pourraient être, ou seront, disponible sous formes de capsules, crèmes applicable ou mangeables (semblables à un yogourt), en tablettes et même sous forme de poudre séchée (Technologie BiolActis Inc., 2010).

Les différents MPMs développés diffèrent par leur composition initiale en protéines de lactosérum ainsi que par les conditions et temps de fermentation. Plusieurs produits sont en

cours d'étude et certains d'entre eux seront plus particulièrement utilisés au cours de notre étude (Technologie BiolActis Inc., 2010).

Ainsi, le MPM-FB036 est désormais étudié dans le cadre du programme de gestion du syndrome métabolique en relation avec la gestion du poids corporel. Le MPM-FB036 est testé pour le contrôle du poids dans un modèle de diète riche en fructose et lipides et d'obésité induite par les hormones. Le MPM-FB036 empêche le tissu adipeux mince de devenir un tissu adipeux obèse. Le MPM-FB036 contribuerait à l'état de satiété ce qui explique en partie la perte de poids ainsi que la réduction de nourriture consommée. De plus, il réduit significativement l'hypertension après 4 semaines d'administration. L'expansion du tissu adipeux durant une prise de poids mène au recrutement de macrophage par les adipocytes. Le MPM-FB036 préviendrait aussi l'obésité du à l'activation de la voie Th17 en régulant négativement la réponse granulocyte dépendante impliquée dans le recrutement de cellules immunes telles que les macrophages dans le tissu adipeux (Technologie BiolActis Inc., 2010).

Dans le programme d'immunothérapie de BiolActis, parmi les produits en développement, le MPM-PC010 est intéressant pour ses propriétés potentielles comme stimulant immunitaire. Des résultats récents suggèrent que le MPM-PC010 stimulerait les défenses naturelles en augmentant le nombre de cellules polymorphonucléaires (PMN) responsables de la première reconnaissance et la destruction des pathogènes (Beaulieu *et al.*, 2009). Le mécanisme d'action de la stimulation des cellules PMN pourrait être relié à la stimulation de la voie Th17 chez des individus sains et en santé, qui stimule la défense immune granulocyte-dépendante (Technologie BiolActis Inc., 2010).

1.9.2 Substances immunomodulatrices du lactosérum

Jusqu'à présent, les protéines de lactosérum ont surtout été étudiées pour leur effets positifs sur l'endurance et la reconstruction musculaire (Tipton *et al.*, 2004). La découverte des propriétés antioxydantes de ces protéines a permis d'anticiper un potentiel bénéfique pour la santé dans les cas de cancer et de maladies associées au système immunitaire (Bounous *et*

al., 1991). Conséquemment, de nos jours, plusieurs des recherches faites sur les protéines et peptides provenant du lactosérum sont axées sur la mise en évidence de leurs bienfaits respectifs sur le système immunitaire (revue dans Beaulieu *et al.*, 2006). Le lactosérum contient plusieurs types de protéines ainsi que les peptides dérivés de celles-ci. Les protéines retrouvées dans le lactosérum sont principalement la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine, la lactoferrine, les immunoglobulines (Ig) et l'albumine sérique bovine (BSA) (revue dans Beaulieu *et al.*, 2006).

La β -lactoglobuline est la protéine la plus abondante du lactosérum, elle constitue de 55 à 65% des protéines totales. Bounous et Kongshavn (1985) furent les premiers à démontrer les effets immunostimulants de la β -lactoglobuline. Cette protéine possède un effet stimulateur sur les splénocytes de la rate (Bounous *et al.*, 1991; Wong *et al.*, 1998) et augmente la production de GSH (Bounous *et al.*, 1991). Les peptides dérivés de la β -lactoglobuline sont nombreux et certains encore inconnus. Certains de ces peptides ont démontré une activité antimicrobienne (Pellegrini *et al.*, 2001). D'autres sont reconnus comme transporteurs de petites molécules hydrophobes comme l'acide rétinoïque, un modulateur important dans la réponse lymphocytaire (Guimont *et al.*, 1997). Le peptide β -lactotensine permet la régulation de la contraction des muscles lisses de l'iléum (Yamauchi *et al.*, 1992) et a aussi un effet stimulant sur les cellules musculaires lisses *in vitro* (Pihlanto-Lepalla *et al.*, 1997). Plusieurs maladies, comme l'asthme, l'athérosclérose et les allergies sont associées à un dysfonctionnement des muscles lisses (Yoshida *et al.*, 2005). Par son effet stimulateur sur les cellules musculaires lisses, il semble que la β -lactotensine permet d'améliorer l'état de santé général. La β -lactoglobuline est responsable des allergies au lait (Host, 2002). Par contre, la consommation de peptides dérivés de celle-ci augmente la tolérance orale et diminue la production d'IgE spécifique à la β -lactoglobuline (Pecquet *et al.*, 2000).

L' α -lactalbumine constitue 15 à 25 % de la quantité totale des protéines du lactosérum. Cette protéine possède de nombreux acides aminés essentiels et est peu immunogène (Matsumoto *et al.*, 2000). Dès 1980, plusieurs études démontraient déjà les propriétés

immunostimulantes de l' α -lactalbumine (Bounous *et al.*, 1981; Bounous *et al.*, 1983), mais ce n'est qu'en 1997 qu'il a clairement été démontré qu'elle induisait des effets stimulateurs. En effet, elle augmente la production d'IL-1 α produite par les macrophages (Wong *et al.*, 1997). L' α -lactalbumine possède aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti-nociceptives par sa capacité à inhiber la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) et la phospholipase A2, ce qui mène à une diminution de la production de l'IL-6 et de la PGE2 (Yamaguchi *et al.*, 2008). Autre propriété très intéressante, elle induit l'apoptose des cellules tumorales et immatures, sans affecter les cellules normales (Hakansson *et al.*, 1999; Svensson *et al.*, 2000). Les nombreux peptides dérivés de l' α -lactalbumine possèdent plusieurs propriétés, comme la régulation de l'activité des lymphocytes B et T, la stimulation de l'adhérence et de la phagocytose des macrophages ainsi que la stimulation de la réponse oxydative explosive (Bounous *et al.*, 1985; Gattegno *et al.*, 1988; Jaziri *et al.*, 1992; Kayser *et al.*, 1996).

La lactoferrine est en faible quantité dans le lactosérum dont elle compose que 1 à 2 % de la quantité totale des protéines. Elle est une glycoprotéine anti-oxydante possédant un site de liaison au fer. C'est la plus étudiée des protéines du lactosérum et aussi la meilleure substance immunomodulatrice provenant du lait. Sa capacité anti-oxydante découle du site de liaison au fer, ce site est aussi en partie responsable de son potentiel antimicrobien (Baldwin *et al.*, 1984; Bezwoda *et al.*, 1989). La lactoferrine est retrouvée dans le colostrum, dans les sécrétions des muqueuses et dans les granules des neutrophiles (Masson *et al.*, 1968; Masson *et al.*, 1969; Masson *et al.*, 1971). La présence de lactoferrine dans ces sites impliqués dans l'acquisition de l'immunité suggère une importante contribution de celle-ci à la santé immune. La lactoferrine peut donc agir comme agent immunosuppresseur anti-inflammatoire ou comme immunostimulant. Elle peut agir à plusieurs niveaux différents et l'effet final dépend souvent de l'état initial, ainsi que de l'organe ou du type de cellules étudié. Donc, son effet anti-inflammatoire est généralement constaté dans des modèles d'inflammation aigue *in vitro* ou *in vivo*, et son effet immunostimulant dans des cas normaux ou d'immunosuppression. Sa capacité de modifier la production de plusieurs cytokines va affecter les multiples populations cellulaires différemment selon leur état initial mais les mécanismes impliqués ne sont que peu connus (Beaulieu *et al.*, 2006). La lactoferrine possède un effet anti-inflammatoire dans les modèles animaux et inhibe les cytokines inflammatoires comme le

TNF- α , l'IL-1 β et l'IFN- γ (Machnicki *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1997; Hayashida *et al.*, 2004; Kimber *et al.*, 2002). La lactoferrine permet aussi l'augmentation de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Hayashida *et al.*, 2004). Il est reconnu que la lactoferrine stimule l'immunité mucoale par l'intermédiaire de plaques de Peyer (Debbabi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000), mais elle exerce aussi plusieurs autres effets sur l'organisme. Elle régule la myélopoïèse (Broxmeyer *et al.*, 1980; Bagby *et al.*, 1989 ; Crouch *et al.*, 1992), stimule la prolifération lymphocytaire (Wong *et al.*, 1997), permet la promotion de la différenciation des lymphocytes B et T (Zimecki *et al.*, 1995) et augmente la disponibilité des cellules NK, CD8+ et CD4+ (Wang *et al.*, 2000; Sekine *et al.*, 1997; Iigo *et al.*, 1999). La lactoferrine et les peptides dérivés peuvent augmenter l'activité de phagocytose des neutrophiles aussi bien que l'interleukine 8 (IL-8) (Miyachi *et al.*, 1998; Shinoda *et al.*, 1996) et peuvent se lier aux motifs CpG présents dans l'ADN bactérien et ainsi prévenir l'effet stimulateur sur les lymphocytes B (Britigan *et al.*, 2001). Les peptides dérivés de la lactoferrine peuvent inhiber la production d'IL-6 suite à une stimulation par le LPS (Mattsby-Baltzer *et al.*, 1996) et augmentent l'apoptose des lignées de cellules leucémiques par l'augmentation de la production de métabolites oxygénés réactionnels (ROS) par les cellules phagocytaires (Yoo *et al.*, 1997).

Les immunoglobulines, présentes à 10% dans le lactosérum, contiennent des IgG1, IgM, IgA et des IgG2. Elles permettent l'augmentation de la production de glutathion (Bounous *et al.*, 1989). L'albumine sérique bovine (BSA) augmentent le GSH et stimule l'activité des splénocytes (Bounous *et al.*, 1991; Bounous *et al.*, 2003). Les glycomacropéptides ou GMP suppriment la prolifération cellulaire causée par une stimulation avec des agents mitogènes comme le PHA et le LPS (Otani *et al.*, 1992; Otani *et al.*, 1995) et stimulent la prolifération et la phagocytose des macrophages (Li *et al.*, 2004).

Finalement, plusieurs des peptides issus de ces protéines de lactosérum peuvent avoir une activité agoniste ou antagoniste aux substances opioïdes, en interagissant avec le récepteur aux opioïdes ou en bloquant les substances supposées s'y lier. Il semble que les peptides dérivés de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline sont des agonistes des opioïdes, et ceux issus de la lactoferrine des antagonistes aux opioïdes. La stimulation ou l'inhibition de

l'activité qui découle de l'activation du récepteur opioïde peut provoquer plusieurs effets. Celui-ci est surtout connu pour son effet sur le contrôle de la douleur, mais il semble être impliqué dans plusieurs autres processus encore méconnus et peut avoir un effet positif sur l'inflammation et sur le système immunitaire (Shah, 2000).

1.10 Hypothèses et objectifs de la recherche

Les désordres inflammatoires intestinaux impliquent souvent un déséquilibre de la microflore intestinale pouvant être rétablie par l'ingestion de bactéries probiotiques. Les produits BiolActis proviennent de la fermentation de lactosérum par des bactéries lactiques probiotiques. Les propriétés immunostimulatrices et/ou anti-inflammatoires de plusieurs composantes du lactosérum et de la bactérie *L. kefiranofaciens* ont déjà été démontrées dans plusieurs modèles. Dans cette optique, Les Technologies BiolActis Inc. ont développé une gamme de produits destinés au contrôle des maladies intestinales inflammatoires.

L'objectif principal de ce projet est de vérifier les propriétés immunomodulatrices et/ou anti-inflammatoires de certains produits obtenus par la fermentation du lactosérum à l'aide de souches sélectionnées de *L. kefiranofaciens* développées par Les Technologies BiolActis Inc soit *in vitro* à l'aide de macrophages et/ou de cellules intestinales, soit *in vivo* dans un modèle murin de colite expérimentale. Ces produits, soit les matrices protéiques malléables (MPMs) générés par fermentation, ainsi que les substances bactériennes provenant de *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2, pourraient posséder la capacité de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires à l'avantage des cytokines anti-inflammatoires. Comme les macrophages et les cellules épithéliales intestinales sont directement impliqués dans la production de cytokines inflammatoires et suppressives et qu'ils peuvent entrer en contact direct avec les diverses molécules contenues dans les produits BiolActis, il est postulé que ces cellules seraient directement impliquées dans la diminution des cytokines pro-inflammatoires et la diminution de l'état inflammatoire intestinal par certains des produits générés par BiolActis.

Les niveaux de production de cytokines pro et anti-inflammatoires par les macrophages, cellules épithéliales et autres cellules de l'organisme influence le degré et le type

d'inflammation développé. Les cytokines pro-inflammatoires IL-6, TNF- α , IL-8, IL-17 et l'IL-23 et anti-inflammatoires IL-10 et PGE2 sont respectivement impliquées dans les mécanismes d'inflammation intestinale ainsi que dans les mécanismes de tolérance immune orale. Il est postulé que les dérivés des produits de BiolActis favoriseraient la production de l'IL-10 et/ou de la PGE2 ou entraînerait une diminution principalement de l'IL-6 et de l'IL-17.

La production de ces cytokines impliquent plusieurs facteurs de transcription et les voies les plus connues impliquent les MAPK p38 et ERK1/2, la COX-2 et NF- κ B. L'IL-1 β est reconnue pour induire un état inflammatoire chez les cellules épithéliales intestinales et le peptidoglycane pour activer le TLR-2 chez les macrophages ainsi que la production de cytokines impliquées dans l'inflammation intestinale causée par des bactéries Gram positif indésirables. Comme les lactobacilles utilisés dans la production des dérivés de BiolActis sont des bactéries Gram+, il est postulé que ces lactobacilles pourraient entraîner une stimulation des cytokines via le peptidoglycane présent dans leur paroi. Cette hypothèse sera vérifié par l'étude des effets de *L. kefiranofaciens* et du PEP chez des macrophages ou de l'IL-1b chez les cellules épithéliales. La production de certaines de ces cytokines en condition inflammatoire simulée, par l'ajout de PEP chez les macrophages et par l'ajout d'IL-1 β chez les cellules épithéliales sera vérifiée. Il a été alors possible d'étudier l'implication des diverses voies de signalisation cellulaire responsables de la modification de la production de cytokine par les produits par l'ajout d'inhibiteurs spécifiques à plusieurs voies de signalisation intracellulaire pouvant être impliquées.

Les probiotiques sont maintenant reconnus pour leurs propriétés régulatrices de l'homéostasie intestinale, donc il est proposé que l'administration des MPMs et de la souche bactérienne lors de colite expérimentale légère chez des animaux pourrait avoir un effet anti-inflammatoire en induisant les cytokines et cellules suppressives impliquées. L'utilisation d'un modèle animal de colite légère induite avec une faible quantité de sulfate de dextran sodium semble appropriée pour l'étude des effets de la consommation simultanée ou préventive des produits BiolActis lors de colite légère. Des études *in vivo* ont été réalisées chez des groupes de souris traitées simultanément ou de façon préventive avec des produits choisis lors de colite expérimentale causée par le DSS, ainsi que l'évaluation de paramètres

immunologiques, tels le dosage de cytokines par ELISA ou RT-PCR semi quantitatif en temps réel et l'immunomarquages des populations lymphocytaires des tissus intestinaux ont permis de déterminer les molécules et cellules impliquées dans l'effet des produits BiolActis. Il est proposé que les produits de BiolActis ont modulé différents sous types de cellules immunes de l'intestin qui ont modifié l'inflammation intestinale expérimentale.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Animaux

Les souris femelles C57BL/6 âgées de 4 à 6 semaines et pesant environ 20 g proviennent de laboratoires certifiées sans pathogène (Charles River, St-Constant, Québec, Canada). Elles subissent une période d'adaptation de 2 semaines avant leur utilisation. Elles sont soumises à un cycle lumière-obscurité de 12 h/12 h. L'eau de breuvage régulière ou la solution de DSS, ainsi que la nourriture sont fournis *ad libitum*. Les expérimentations *in vivo* sont autorisées par le Comité Institutionnel de la Protection des Animaux (CIPA) de l'Université du Québec à Montréal.

2.2 Cellules

2.2.1 Les cellules épithéliales intestinales humaines

La lignée cellulaire Caco-2, des cellules épithéliales d'adénocarcinome de côlon humain, a été obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Virginie, États-Unis). Ces cellules sont cultivées dans le milieu de culture RPMI 1640 HyClone additionné de 10% le sérum de veau fœtal (SVF) HyClone (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Le milieu de culture RPMI complet contient aussi 50 unités/mL de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine et 100 µg/ml de néomycine (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, États-Unis), appelé milieu complet. La solution tampon PBS provient de Gibco (Carlsbad, Californie, États-Unis). Les cellules Caco-2 sont cultivées dans des flacons de 650 mL pour culture de cellules adhérentes avec une surface de culture de 175 cm² de marque Sarsted (Nümbrecht, Allemagne) dans du milieu RPMI 1640 complet. Les cellules sont cultivées sous une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂ à 37°C. Lorsque les cellules atteignent 80% de confluence, elles sont séparées par traitement à la trypsine-EDTA (Sigma-

Aldrich) et incubées à 37°C pendant 5-10 minutes, ou jusqu'à ce que les cellules décollent, et sont réensemencées à une concentration de $2,5 \times 10^5$ cellules par mL. Les cellules Caco-2 sont utilisées entre le 9^e et le 14^e passage compte tenu de leur niveau optimal de croissance. Les cellules sont alors récoltées et mises en culture dans des plaques de 24 puits à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules/mL durant 48 h. Les cellules Caco-2 sont alors prêtes à subir les différents traitements. Selon les expériences, les produits BiolActis sont ajoutés à la dilution finale appropriée. Le volume final est ajusté à 1 mL avec du RPMI 1640 complet. Les cellules sont incubées 24 h et le surnageant est récupéré pour l'analyse des cytokines par ELISA et les cellules sont soumises à des marquages pour la détermination des niveaux de toxicité révélée par des tests de nécrose et d'apoptose.

2.2.2 Culture primaire de splénocytes de souris C57BL/6

Les souris C57BL/6 sont euthanasiées par inhalation de dioxyde de carbone et la rate est prélevée et conservée dans du RPMI 1640 complet froid (4°C). La rate est ensuite broyée sur un tamis cellulaire 70 μ m (BD Bioscience, San Diego, Californie, États-Unis) et les cellules sont recueillies dans du RPMI 1640 complet. La concentration cellulaire totale est ajustée à $5,5 \times 10^5$ cellules/mL. Ensuite, 900 μ L de cette suspension est déposé dans chaque puits d'une plaque adhérente de 24 puits pour obtenir 5×10^5 cellules par puits. Les plaques utilisées sont des plaques Costar[®] adhérentes, avec puits de 15,6 mm et d'une surface de 1,9 cm², de la compagnie Corning (New York, États-Unis). Les splénocytes sont alors prêts à subir les différents traitements. Le volume final est ajusté à 1 mL avec du RPMI 1640 complet. Les splénocytes sont ensuite incubés dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂ à 37°C.

2.2.3 Culture primaire de macrophages spléniques de souris C57BL/6

Les souris C57BL/6 sont euthanasiées et la rate est prélevée et conservée dans du RPMI 1640 complet froid (4°C). La rate est ensuite broyée sur un tamis cellulaire 70 μ m (BD Bioscience) et les cellules sont recueillies dans du RPMI 1640 complet. La quantité de macrophage estimée dans la rate est d'environ 10%. La concentration cellulaire totale est ajustée à 5×10^6 cellules/mL. Ensuite, 1 mL de cette suspension est déposé dans chaque puits

d'une plaque adhérente de 24 puits pour obtenir environ 5×10^5 macrophages par puits. L'isolation des macrophages se fait par adhérence au plastique. Les macrophages adhèrent en incubant 2 h à 37°C. Les macrophages sont incubés dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂ à 37°C. Ensuite, elles sont lavées délicatement avec du PBS afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Un 2^e lavage délicat est effectué pour éliminer les cellules non adhérentes. Les macrophages sont alors prêts à être utilisés dans les divers protocoles. Le volume final est ajusté à 1 mL avec du RPMI 1640 complet.

2.3 Préparation des produits BiolActis

2.3.1 Préparation de la souche bactérienne et pasteurisation

Une petite quantité de bactéries lyophilisées *L. kefiranofaciens* R2C2 de Technologie BiolActis (Laval, Québec, Canada) est ajoutée au milieu de culture liquide pour lactobacilles RCW (BiolActis, Laval, Québec, Canada). Les bactéries sont cultivées durant 48 h à 30°C, la concentration finale est d'environ 1×10^9 bactéries par mL. La culture bactérienne est centrifugée à 800 x g pendant 10 min. Le culot de bactéries est lavé deux fois avec du PBS stérile. Les cultures bactériennes sont incubées dans un bain à 70°C durant 25 minutes et sont ensuite diluées avec du PBS stérile pour utilisation dans les expériences *in vitro* ou *in vivo*. Cette incubation permet de pasteuriser la préparation bactérienne et empêche sa croissance.

2.3.2 Préparation des extraits solubles des MPMs de BiolActis

Les différentes préparations de MPMs : PC010, 16h, 48h, FB030-2 et FB036 sont des lots produits par les Technologies BiolActis et nous sont fournies sous forme d'une préparation liquide conservée à 4°C. Ces préparations sont centrifugées à 800 x g pendant 10 min et le surnageant est recueilli. La composition et la concentration en diverses substances des produits BiolActis en développement est strictement confidentielle. Diverses dilutions de ce surnageant sont préparées avec du PBS stérile et utilisées dans les expériences *in vitro* et *in vivo*.

2.4 Étude des propriétés immunomodulatrices des extraits solubles des MPMs

2.4.1 Effet des produits BiolActis sur les cellules Caco-2 activées avec l'IL-1 β

Les cellules Caco-2 ont été mises en culture dans des plaques de 24 puits à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules/mL durant 48 h, est stimulée par l'ajout de 32 ng/mL d'IL-1 β humaine. Les produits BiolActis sont ajoutés à la dilution finale optimale 2 h après l'ajout de l'IL-1 β . Le volume final est ajusté à 1 mL avec du RPMI 1640 complet. Les cellules sont incubées 24 h et le surnageant est récupéré pour analyse des cytokines par ELISA. La cytotoxicité des produits est évaluée par cytofluorométrie, tel que décrit plus loin. Les expériences sont effectuées en triplicata.

2.4.2 Effet des produits BiolActis sur les macrophages activés par le peptidoglycane (PEP), en présence/absence d'inhibiteurs de récepteur membranaire ou de voies de signalisation

Afin de simuler les effets induits par la paroi Gram+ des lactobacilles, les macrophages de rate de souris C57BL/6 sont isolés par adhérence et ajustés à une concentration de 5×10^5 cellules par mL. Les cellules sont incubées dans une atmosphère humidifiée de 5% de CO₂ à 37°C. Une première série d'expériences est réalisée avec des macrophages traités avec du PEP hautement purifié obtenu de Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, États-Unis) à une concentration finale de 10 μ g/mL et incubés 2h, et ensuite traités avec les différents produits de BiolActis à une dilution optimale. Les surnageants sont récoltés pour le dosage de cytokines par des tests ELISA. Les expériences sont effectuées en triplicata.

Des macrophages traités de façon similaire sont alors mis en contact avec des inhibiteurs des voies des MAPK ERK1/2 et p38, du récepteur aux opiacés, de la voie du NF-kB et de la voie de la COX-2 à leur concentration finale respective. La concentration d'inhibiteur utilisée est celle recommandée par le manufacturier pour une inhibition complète de la voie de signalisation et couramment utilisée pour des expériences similaires dans la littérature scientifique. Les macrophages sont incubés 1 h avant l'ajout des différents produits soluble

de BiolActis. Les inhibiteurs utilisés sont le U 0126 (iERK) à 10 μ M final, le SB 203580 (iP38) à 10 μ M, la naltrexone (iRO) à 10 μ M, le SN-50 (iNFkB) à 18 μ M et le COX-2 Inhibitor II (iCOX2) à 20 μ M et ils proviennent tous de Calbiochem (San Diego, Californie, États-Unis). Les fractions solubles des divers MPMs de BiolActis sont ensuite ajoutées à une dilution finale de 1/500 et la suspension bactérienne R2C2, à une dilution finale de 1/100. Les cellules sont incubées dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂ à 37°C. Les surnageants sont récoltés après 24 h et les cytokines dosées par des tests ELISA. Les expériences sont effectuées en triplicata. Les effets inhibiteurs spécifiquement induits par les différents produits de BiolActis seront déterminés par comparaison avec les effets inhibiteurs spécifiquement induit par le PEP.

2.5 Expériences *in vivo* dans un modèle de colite expérimentale induite par le sulfate de dextran sodium (DSS)

2.5.1 Induction de la colite par le sulfate de dextran sodium

L'inflammation intestinale est induite par administration orale de sulfate de dextran sodium (DSS) dans l'eau de breuvage. Le DSS utilisé pour déclencher le processus d'inflammation intestinale est d'un poids moléculaire de 36 à 50 kDa et provient de MP Biomedicals (Solon, Ohio, États-Unis). Le DSS est dissous dans l'eau de breuvage fournie aux animaux à une concentration de 2,5% (poids/volume). La solution de DSS et les bouteilles d'eau sont remplacées à tous les 2 jours, par une bouteille propre avec une solution fraîche. Les animaux sont ensuite exposés à la solution de DSS *ad libitum*. L'addition de DSS dans l'eau n'a pas influencé la consommation d'eau par l'animal, tel que déterminé par la quantité d'eau résiduelle lors des changements de bouteille. Les caractéristiques de la substance DSS et sa stabilité en solution ont déjà été démontrées (Bylund-Fellenius *et al.*, 1994).

2.5.2 Étude *in vivo* de l'administration simultanée de MPM de BiolActis lors de l'induction et pendant la colite expérimentale

Les souris sont acclimatées à la présence de l'expérimentateur pendant une semaine. Chaque groupe est composé de 4 souris femelles C57BL/6. Elles sont pesées à tous les jours. Les groupes DSS et MPM+DSS ont reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage pendant les 6 premiers jours. Les souris du groupe DSS+MPM ont reçu en plus 100 μ L de MPM par 20g (poids) par gavage oral à tous les jours. Le groupe contrôle n'a pas de DSS dans son eau de breuvage, il reçoit 100 μ L d'eau stérile par 20g (poids) par gavage oral à tous les jours. Le groupe contrôle MPM n'a pas été inclus dans les résultats compte tenu de mortalité imprévue dont la cause n'avait aucun lien avec les effets du MPM. Le taux d'hématocrite a été mesuré aux jours 0, 4 et 8. Les souris sont euthanasiées au jour 10 par inhalation de CO₂. Le petit intestin est prélevé en coupant 0,5 cm sous l'estomac et 1 cm au dessus du caecum, et le côlon en coupant après le caecum et 0,5 cm avant l'anus. Les petits intestins sont utilisés pour l'analyse des populations lymphocytaire par cytofluorométrie. Les côlons sont mesurés et pesés. Un morceau de côlon de un centimètre est prélevé et conservé dans du RNA Later (Ambion/Applied Biosystems, Foster City, Californie, États-Unis) pour extraction ultérieure de l'ARN. Le reste du côlon est broyé avec 1 mL de PBS froid pour le dosage des cytokines. Tous les échantillons sont conservés à -80°C.

2.5.3 Étude *in vivo* d'administration préventive des produits BiolActis avant l'induction et pendant la colite expérimentale

Les souris sont acclimatées à la présence de l'expérimentateur pendant une semaine. Chaque groupe est composé de 6 souris femelles C57BL/6 afin d'améliorer la valeur statistique des résultats compte tenu de la variation individuelle présumée. Elles sont pesées à tous les jours. Les souris reçoivent un prétraitement de 7 jours avec le MPM ou avec le produit de BiolActis R2C2 avant l'ajout de DSS dans leur eau de breuvage et ce traitement est continué jusqu'à l'euthanasie de l'animal. Les groupes DSS, MPM+DSS et le groupe R2C2+DSS ont reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Le groupe contrôle n'a pas de DSS dans son eau de breuvage, il reçoit 100 μ L d'eau stérile par

20g (poids) par gavage oral à tous les jours. Les souris du groupe MPM et du groupe MPM+DSS ont reçu 100 μ L de MPM par 20g (poids) par gavage oral à tous les jours. Les souris du groupe R2C2 et du groupe R2C2+DSS ont reçu 100 μ L de suspension bactérienne R2C2 non diluée par 20g (poids) par gavage oral à tous les jours. Les aiguilles de gavage oral proviennent de (Thermo Fisher Scientific). Le taux d'hématocrite est mesuré aux jours 0, 7, 10 et 14 à l'aide de tubes capillaires pour le prélèvement de sang (Thermo Fisher Scientific, Waltman, Massachusetts, États-Unis). Les souris sont euthanasiées au jour 14 par inhalation de CO₂. Le petit intestin est prélevé en coupant 0,5 cm sous l'estomac et 1 cm au dessus du caecum, et le côlon en coupant après le caecum et 0,5 cm avant l'anus. Les petits intestins sont utilisés pour l'analyse des populations lymphocytaire par cytofluorométrie. Les côlons sont mesurés et pesés. Un morceau de côlon de un centimètre est prélevé et conservé dans du RNA Later pour l'extraction ultérieure de l'ARN. Le reste du côlon est broyé avec 1 mL de PBS froid et le surnageant est conservé pour le dosage des cytokines. Tous les échantillons sont conservés à -80°C.

2.6 Mesure de la cytotoxicité cellulaire induite par les produits BiolActis sur les cellules en culture

L'analyse de la cytotoxicité est faite avec le produit Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Allemagne) qui permet de détecter et de quantifier l'apoptose et la nécrose cellulaire. Les cellules récoltées sont traitées et marquées à l'annexine V-FITC et à l'iodure de propidium selon les recommandations du manufacturier et ensuite analysées par cytofluorométrie avec l'appareil FACScan (BD Bioscience, San Diego, Californie, États-Unis). Les cellules apoptotiques sont Annexine V + seulement, alors que les cellules nécrotiques sont Annexine V + et Iodure de propidium +. L'analyse multiparamétrique permet d'obtenir le pourcentage de chacune de ces cellules. Les analyses sont effectuées en triplicata.

2.7 Dosage de cytokines par ELISA

Les dosages de l'IL-6, de l'IL-10, et du $\text{TNF}\alpha$, chez la souris sont effectués avec les tests ELISA (BD Bioscience, San Diego, Californie, États-Unis), soit les tests BD OptEIA™ Set Mouse IL-6, BD OptEIA™ Set Mouse IL-10, et Mouse TNF ELISA Set II. Les tests ELISA pour le dosage de la PGE2 chez la souris sont effectués avec le test Enzyme Immunoassay for Prostaglandin E2 (monoclonal) (Oxford Biomedical Research, Oxford, Michigan, États-Unis). Les tests ELISA pour le dosage de l'IL-8 produite par les cellules d'origine humaine Caco-2 sont effectués avec le kit Human IL-8 ELISA MAX™ Set Standard (BioLegend, San Diego, Californie, États-Unis). Les plaques utilisées pour les tests ELISA, lorsque non fournies dans le kit du manufacturier, sont des plaques Nunc, Immuno 96 MicroWell™ Plates, à fond plat, de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, États-Unis). Tous les tests ELISA sont effectués selon les recommandations standards des manufacturiers respectifs avec un volume prédéterminé, soit 50 ou 100 μL de surnageant de culture cellulaire ou de surnageant de lysat de côlon. Les dosages sont effectués en triplicata.

2.8 Prélèvement, isolement et purification des lymphocytes intraépithéliaux, de la lamina propria et des plaques de Peyer de l'intestin grêle.

La méthode suivante est adaptée du protocole développé par Lefrançois et Lycke (1996). Les solutions stock HEPES 1M, HBSS 10x normale et HBSS 10x sans calcium et sans magnésium, la solution EDTA 1M ainsi que le bicarbonate de sodium en poudre proviennent de Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, États-Unis). La solution sans calcium-sans magnésium (CMF) est constituée de HBSS 1x (sans calcium et sans magnésium), de 10% v/v de solution tampon HEPES-Bicarbonate et de 2% v/v de SVF. La solution CMF/EDTA/SVF est constituée de 90% v/v de HBSS 1x normal, 10% v/v de SVF et contient 15 mM d'HEPES, de 5 mM d'EDTA et est ajustée à pH 7.2. La solution tampon HEPES-Bicarbonate 10x, contient 100 mM D'HEPES final et 250 mM de sodium bicarbonate et est ajustée à pH 7.2. La solution RPMI/Collagénase VIII est constituée de RPMI 1640, de 10% v/v SVF et de 3,4 mg de Collagénase VIII, soit 50 U/mL final.

Les souris sont euthanasiées et le petit intestin est prélevé en coupant 0,5 cm sous l'estomac et 1 cm au dessus du caecum. Il est ensuite déposé dans un pétri stérile avec un peu de RPMI 1640 afin qu'il ne sèche pas. Les intestins sont nettoyés mécaniquement avec des pinces et en injectant environ 40 mL de solution CMF à 4°C à l'intérieur de l'intestin avec une seringue munie d'une aiguille de taille 18-20 G.

Une pression légère est appliquée pour laver l'intérieur de l'intestin et le débarrasser des matières fécales. L'intestin lavé est déposé dans un nouveau pétri avec du RPMI à 4°C et le tissu conjonctif et le gras sont enlevés avec une pince. Les plaques de Peyer sont prélevées pour l'analyse des populations cellulaires. Elles sont conservées dans un tube de 50 mL contenant du RPMI froid sur glace et ensuite broyées sur tamis cellulaire 70 µm. L'intestin est coupé longitudinalement et ensuite latéralement en pièces de 0,5 cm. Les pièces d'intestin sans plaques de Peyer sont déposées dans un tube stérile de 50 mL avec 40 mL de CMF à 4°C. Le tube est inversé plusieurs fois et les pièces se déposent au fond du tube. Les pièces d'intestin sont ainsi lavées trois fois, ou jusqu'à ce que le surnageant soit assez clair, et ce, afin d'enlever le mucus et les matières fécales résiduelles.

Les pièces d'intestin sont transférées dans un erlenmeyer de polycarbonate qui contient 20 mL de solution CMF/SVF/EDTA préchauffé à 37°C et un barreau magnétique. Les morceaux de deux intestins entiers provenant des souris d'un même groupe peuvent être combinés dans le même erlenmeyer. Les morceaux d'intestin sont incubés 20 min à 37°C sous agitation vive avec un agitateur magnétique. La solution et les pièces d'intestin sont ensuite transférées dans un tube de 50 mL et vortexées à vitesse maximale durant 15 s. Les morceaux d'intestin se déposent au fond du tube et le surnageant est récolté et mis dans un nouveau tube de 50 mL. Cette étape est répétée une autre fois en ajoutant 20 mL de solution CMF/SVF/EDTA aux pièces d'intestin qui seront à nouveau vortexées. Le surnageant recueilli suite au dépôt des pièces d'intestin est combiné au surnageant déjà recueilli dans le tube de 50 mL. Ce surnageant est considéré comme contenant les IELs et est conservé sur glace pendant 10 min. Le culot de débris est éliminé et le surnageant est conservé sur glace. Le tube contenant les IELs est ensuite centrifugé à 400 x g durant 5 min. et le culot est considéré comme contenant la fraction IEL.

Le culot de IELs est alors resuspendu dans 16 mL d'une solution de Percoll 45%, qui est divisé en deux fractions de 8 mL, qui sont ajoutées individuellement sur 5 mL de Percoll 67%, dans 2 tubes individuels de 15 mL. Les diverses solutions de Percoll, 100%, 67%, et 45%, sont préparées avec du Percoll de Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, États-Unis) et avec la solution PBS stérile de Gibco (Carlsbad, Californie, États-Unis). Les tubes sont centrifugés 20 min à 600 x g. La bande contenant les IELs, située à l'interphase, est prélevée dans chaque tube. Les cellules obtenues sont combinées et lavées 2 fois avec du RPMI 1640 complet en centrifugeant à 400 x g pendant 5 min. Les IELs sont resuspendus dans du RPMI complet et le compte cellulaire est effectué.

Les pièces du tissu intestinal subissent encore deux fois un traitement CMF/SVF/EDTA, avec agitation, durant 20 minutes, à 37°C et le surnageant n'est pas récupéré. Les pièces de tissus intestinaux sont lavées avec du RPMI complet à 4°C pendant 5 min pour éliminer l'EDTA résiduel. Les pièces sont ensuite rincées sur un tamis cellulaire de 70 µm et transférées dans l'erlenmeyer original, préalablement rincé au RPMI complet. Un volume de 20 mL de solution RPMI/Collagénase VIII (50 U/mL) préchauffée à 37°C est ajouté aux pièces de tissus et elles sont incubées 1 h à 37°C avec agitation moyennement vive (400 RPM), sur une plaque agitatrice. La collagénase VIII provient de Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, États-Unis). Le surnageant est récolté en transvidant la solution et les pièces d'intestin sur un tamis cellulaire de 70 µm déposé sur un tube de 50 mL. Les pièces et le tamis sont rincées à quelques reprises avec du RPMI 1640 froid. Le tube est centrifugé à 850 x g pendant 10 min. Le surnageant est jeté et les cellules sont lavées en les resuspendant dans 25 mL de RPMI froid pour éliminer la collagénase VIII résiduelle. Les cellules, soit les LPLs, sont centrifugées à 850 x g pendant 10 minutes et le lavage est répété. Les cellules sont encore centrifugées et le culot est resuspendu dans 5 mL de solution de Percoll 45%, qui est ensuite déposé sur 10 mL de Percoll 100% dans un tube de 15 mL. Ce tube est centrifugé à 800 x g sans frein pendant 20 min. La bande contenant les cellules, située à l'interface, est récupérée et les cellules sont lavées deux fois comme précédemment. Le culot contient la fraction LPL. Les LPLs sont resuspendus dans du RPMI complet et le compte cellulaire est effectué.

Les cellules obtenues lors du broyage des plaques de Peyer, les PPLs, sont lavées et resuspendues dans du RPMI complet et le compte cellulaire est effectué. Les PPLs, les IELs et les LPLs sont alors prêts à être phénotypés par différents doubles et triples marquages avec les anticorps monoclonaux fluorescents et analysés en cytofluorométrie.

2.9 Immuno-marquages des cellules intestinales pour analyse par cytofluorométrie

Les cellules provenant des fractions IEL, PPL, et LPL sont séparées en quantité et volume égaux, selon le nombre de doubles ou triples marquages anticipés, effectués en duplicata. Les marquages impliquant les anticorps anti-mouse IL-17A et anti-mouse Foxp3 nécessitent la perméabilisation préalable des cellules pour permettre l'entrée de l'anticorps spécifique à l'intérieur des cellules. Les cellules sont préalablement fixées et perméabilisées avec les produits du Fixation/Permeabilization Kit de la compagnie eBioscience (San Diego, Californie, États-Unis) et ensuite marquées avec les anticorps monoclonaux, selon les recommandations spécifiques du fabricant.

Les différents anticorps monoclonaux spécifiques utilisés pour l'analyse des populations cellulaire par cytofluorométrie, sont le Phycoerythrin (PE) anti-mouse IL-17A, Fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-mouse IL-17A, FITC anti-mouse gamma delta TCR, PE anti-mouse CD4, FITC anti-mouse CD4, Peridinin chlorophyll protein (PerCP) anti-mouse CD8, FITC anti-mouse CD19, PerCP anti-mouse NK1.1 et PE anti-mouse Foxp3 proviennent tous de la compagnie eBioscience (San Diego, Californie, États-Unis). L'appareil de cytofluorométrie utilisé pour mesurer la cytotoxicité ainsi que pour quantifier les diverses populations cellulaires intestinales par immuno-marquages doubles et triples est l'appareil FACScan de la compagnie BD Bioscience. L'analyse multiparamétrique est effectuée sur tous les échantillons et les lectures sont faites en duplicata.

2.10 Analyse de l'expression de l'IL-23 et de l'IL-17A par une technique de RT-PCR semi-quantitatif

Les échantillons de côlon sont broyés et l'ARN total est extrait avec l'ensemble RNAqueous de Ambion/Applied Biosystems (Foster City, Californie, États-Unis), selon les directives du manufacturier. La quantité et la qualité de l'ARN sont déterminées par spectrophotométrie par lecture d'absorbance à 260 nm et le ratio 260/280.

La quantité d'ARN initial est normalisée à 700 ng pour tous les échantillons et il est rétro-transcrit en ADNc avec l'ensemble High-Capacity cDNA reverse transcription kit de Ambion (Foster City, Californie, États-Unis) en utilisant un mélange d'Oligo dT et de Random Hexamers comme amorces, selon les directives du manufacturier. La transcription inverse est effectuée avec l'appareil thermocycleur 7300 d'Applied Biosystems (Foster City, Californie, États-Unis). L'ADN génomique contaminant est éliminé par un traitement régulier de digestion d'ADN avec l'ensemble TURBO DNA-free de Ambion (Foster City, Californie, États-Unis) selon les directives du manufacturier.

Les amorces spécifiques à l'ADNc obtenu des ARNm codant pour l'IL-23 et l'IL-17A chez la souris sont désignées avec le logiciel Primer Express 3.0 de Applied Biosystems (Foster City, Californie, États-Unis) à partir des séquences disponibles dans GenBank pour *Mus musculus* interleukine 17A ARNm, numéro d'accension NM_010552.3, et pour *Mus musculus* interleukine 23, sous-unité alpha p19, ARNm, numéro d'accension NM_031252.2. Les amorces sont commandées chez Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, États-Unis). L'amorce IL-17A sens (forward) possède la séquence 5'-CCT GGC GGC TAC AGT GAA G-3' et l'amorce IL-17A anti-sens (reverse) possède la séquence 5'-TTT GGA CAC GCT GAG CTT TG-3'. L'amorce IL-23 sens (forward) possède la séquence 5'-CCT TCT CCG TTC CAA GAT CCT -3' et l'amorce IL-23 anti-sens (reverse) possède la séquence 5'-GGG CAG CTA TGG CCA AAA-3'. L'expression de ces gènes est normalisée par rapport à l'expression du gène reporteur (housekeeping gene) GAPDH. Les amorces pour le GAPDH sont désignées à partir de la séquence disponible dans GenBank pour *Mus musculus* glyceraldéhyde-3-phosphate dehydrogénase (GAPDH) ARNm, numéro d'accension

NM_008084.2. L'amorce GAPDH sens (forward) possède la séquence 5'-TCC TGC ACC ACC AAC TGC TTA-3' et l'amorce GAPDH anti-sens (reverse) possède la séquence 5'-ATC ACG CCA CAG CTT TCC AGA-3'.

Le PCR semi quantitatif est une technique qui permet de comparer le niveau d'expression d'un gène des échantillons par rapport au contrôle (détecteur). Cette technique est effectuée en utilisant une quantité initiale de 35 ng d'ADNc avec l'ensemble QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix de la compagnie QIAGEN GmbH (Hilden, Düsseldorf, Allemagne), selon les directives du manufacturier, avec une concentration finale en amorces de 0,3 μ M, pour un total de 50 cycles. L'appareil de PCR en temps réel utilisé est l'appareil thermocycleur 7300 d'Applied Biosystems. Le programme utilisé pour effectuer le PCR et pour analyser les données est le programme Sequence Detection Software version 1.4 d'Applied Biosystems. Toutes les réactions de RT-PCR sont effectuées dans des plaques de 96 puits de marque MicroAmp en utilisant les films optiques adhésifs MicroAmp pour les réactions de PCR et les bandelettes de 12 couvercles reliés MicroAmp, tous de la compagnie Applied Biosystems.

2.11 Données et analyses statistiques

Les données sont présentées sous la forme de la moyenne \pm SD, sauf lorsque non approprié. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test t de Student lorsque les groupes ou échantillons sont comparés au témoin contrôle ou entre eux. Il est clairement indiqué sur les figures lorsque les groupes ou échantillons sont comparés entre eux, en absence d'indication spécifique ils sont comparés au contrôle. Les calculs et analyses statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel Excel (Microsoft, San Diego, Californie, États-Unis). Les différences significatives (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) sont indiquées sur les figures lorsqu'approprié. Toutes les expériences *in vitro* sont effectuées en triplicata et tous les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences. Les dosages par ELISA ou par RT-PCR sont effectués en triplicata. Les expériences *in vivo* comprennent un nombre de souris de $n=4$ pour l'étude d'administration simultanée de MPM lors de colite expérimentale et de $n=6$ pour l'étude d'administration préventive des produits BiolActis lors

de colite expérimentale. Les expériences *in vivo* ont été effectuées une seule fois mais des expériences préliminaires ont été réalisées avec peu de souris pour déterminer les conditions optimales des expériences *in vivo*. Les immunomarquages sont effectués en duplicata pour chaque souris des divers groupes.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Effets des produits de fermentation du lactosérum par la souche *L.kefiranofaciens* de BiolActis sur les cellules épithéliales intestinales

3.1.1 Apoptose et nécrose des cellules épithéliales intestinales

Les produits dérivés de la fermentation du lactosérum par *L. kefiranofaciens* sont destinés à une administration orale et peuvent donc agir au niveau de la muqueuse intestinale. Nous avons vérifié l'effet des différents produits solubles de BiolActis sur la viabilité des cellules Caco-2 qui sont des cellules épithéliales intestinales humaines provenant de carcinome de côlon. Différentes fractions solubles des MPMs provenant de différentes conditions de fermentation ont été ajoutées, à différentes dilutions, à des cellules Caco-2 en forte croissance et incubées durant 24 h. Les cellules ont ensuite été marquées avec de l'Annexine V et de l'iodure de propidium (IP) afin d'évaluer les niveaux de nécrose et d'apoptose et analysées en cytofluorométrie. Les résultats de la figure 3.1A montrent que le niveau basal d'apoptose (Annexine5+, IP-) de ces cellules était relativement élevé (environ 60%), cependant l'ajout des produits BiolActis, même à la plus faible dilution, n'a pas augmenté ce niveau. Au contraire, l'ajout du produit PC010 aux cellules Caco-2 a diminué le niveau de nécrose spontanée (Annexine5+, IP+) des cellules Caco-2 ($p \leq 0.05$) (Fig. 3.1B). Le haut niveau d'apoptose et de nécrose basal reflète les difficultés de croissance rencontrées avec cette lignée de cellules. L'état des cellules ne permet pas d'affirmer que les produits n'ont pas d'effet, mais suggère qu'ils n'aggravent pas la situation. Donc, les produits solubles de fermentation de BiolActis ne montrent pas d'effets significatifs sur la viabilité des cellules épithéliales à toutes les dilutions testées. Pour les expériences suivantes, nous avons choisi la dilution 1/500 pour ces produits, car la dilution 1/100 provoque l'augmentation de la nécrose des cellules spléniques.

Ensuite, nous avons aussi vérifié la cytotoxicité de diverses dilutions de la suspension de la souche bactérienne *L. kefiranofasciens* R2C2 sur les cellules Caco-2, car les bactéries sont présentes dans les MPMs. Les bactéries présentes dans la suspension sont préalablement pasteurisées. La figure 3.2 montre que seule la dilution 1/10 a diminué significativement l'apoptose (A) ($p < 0.01$) ainsi que la nécrose (B) ($p < 0.05$) mais pas les dilutions 1/100 et plus. Afin d'éviter toute situation potentielle de cytotoxicité limite avec les différents produits, la dilution 1/500 au lieu de 1/100 a été utilisée dans les expériences subséquentes.

3.1.2 Production d'IL-8 par les cellules épithéliales Caco-2

Dans un second temps, les cellules Caco-2 ont été stimulées avec de l'IL- β afin d'induire la production de l'IL-8. Ces cellules stimulées ont alors été mises en contact avec les préparations solubles des MPMs provenant de différentes conditions de fermentation et les niveaux de sécrétion d'IL-8 ont été dosés après 24 h d'incubation. Tel que montré dans la figure 3.3, l'addition d'IL-1 β a stimulé la production de l'IL-8, tel qu'attendu. L'addition des différents produits à la dilution 1/100 a diminué significativement la production d'IL-8 induite par l'IL-1 β chez les cellules Caco-2 ($p < 0.01$ et 0.05) et ce, avec tous les produits. L'effet inhibiteur a été plus fortement marqué avec le produit 48h à la dilution 1/100. Cet effet inhibiteur s'est maintenu à des dilutions plus fortes avec les produits PC010, FB030-2 et FB036 ($p < 0.05$).

3.2 Effets des produits de fermentation du lactosérum par la souche *L. kefiranofasciens* de BiolActis sur les cellules mononucléaires de la rate (splénocytes) et les macrophages de souris C57BL/6

3.2.1 Apoptose et nécrose des splénocytes

Afin de déterminer les effets des différents produits de BiolActis sur la viabilité des cellules mononucléaires spléniques, une suspension de cellules de la rate est incubée avec différentes dilutions des extraits solubles des produits de fermentation durant 24 h. Les cellules ont ensuite été marquées avec de l'IP et de l'Annexine 5 et analysées en

cytofluorométrie. Les résultats présentés dans la figure 3.4A indiquent que l'apoptose spontanée de ces cellules est diminuée par les différents produits solubles de BiolActis et ce, même à des dilutions très fortes ($p < 0.01$). Les produits PC010 et FB030-2 ont induit de la nécrose cellulaire seulement avec la dilution la plus faible (Fig. 3.4B) ($p < 0.01$). Donc, la dilution 1/500 a été choisie pour la réalisation des expériences sur les fonctions cellulaires. D'autre part, les préparations de BiolActis contiennent aussi des cellules bactériennes impliquées dans la fermentation. Nous avons alors testé la cytotoxicité de différentes dilutions de cellules de la souche de *L. kefiranofaciens* R2C2 pasteurisée sur les splénocytes de souris C57BL/6. Tel que montré dans la figure 3.5, les résultats indiquent que l'addition de la suspension bactérienne n'a pas influencé significativement le niveau d'apoptose (Annexine 5+ IP-) (Fig. 3.5A) ainsi que le niveau de nécrose (Annexine 5+ IP+) (Fig. 3.5B), sauf avec la concentration la plus forte pour laquelle une légère augmentation de nécrose a été observée ($p \leq 0.05$).

3.2.2 Effets des produits de BiolActis sur la production de cytokines par les macrophages spléniques

Compte tenu de la faible cytotoxicité pour les cellules mononucléaires spléniques des produits solubles de BiolActis, les macrophages spléniques ont été isolés par adhérence et mis en contact avec différentes dilutions des produits de BiolActis. La stimulation de la production de cytokines pro-et anti-inflammatoires (IL-6, IL-10 et PGE2) a été quantifiée par des tests ELISA. Les niveaux de cytokines produites, étaient très faibles, car les résultats se trouvaient sous la courbe standard et ne pouvaient pas être significatifs. Ces résultats suggèrent que les produits de BiolActis ne sont pas des inducteurs de cytokines macrophagiques. Par contre, ces mêmes produits peuvent moduler avec les voies d'activation impliquées dans la production de ces cytokines. Nous avons alors étudié cette hypothèse en deux étapes; la première consistant à déterminer les effets de l'addition des produits de BiolActis sur des macrophages préalablement activés par le peptidoglycane (PEP) afin de simuler l'effet de la présence de la paroi bactérienne et des dérivés solubles produits par la fermentation du lactosérum par la souche *L. kefiranofaciens*, et la seconde, en étudiant les effets de ces mêmes produits sur des macrophages activés par le PEP mais en présence

d'inhibiteurs de différentes voies de signalisation impliquées dans la production de l'IL-6, de l'IL-10 et de la PGE2. Ainsi, les macrophages ont été stimulés par le PEP en absence et en présence d'inhibiteurs contre les MAPK ERK et p38, le NF- κ B et la COX-2. Un inhibiteur des récepteurs opioïdes a aussi été ajouté compte tenu de la présence dans le lactosérum de peptides laitiers pouvant activer ces récepteurs et diminuer la production des cytokines inflammatoires (Sacerdote, 2003).

3.2.3 Effets des produits de BiolActis sur la production d'IL-6 par les macrophages spléniques

La figure 3.6A montre que le PEP induit fortement la production de l'IL-6 chez des macrophages spléniques mais cette production est diminuée principalement par les inhibiteurs de la Cox-2 ($p < 0.01$), suggérant que la production de cette cytokine passe partiellement par cette voie. Par contre, la production d'IL-6 est augmentée suite à l'ajout des inhibiteurs de la MAPK p38 et du récepteur opioïde ($p < 0.01$ et 0.05), suggérant que ces voies sont plutôt impliquées dans l'inhibition de la production d'IL-6. L'inhibition de NF- κ B, du récepteur opioïde et des voies ERK 1/2 semble augmenter la production d'IL-6 par le PEP, ce qui peut être surprenant si on considère que le facteur NF- κ B est directement impliqué dans la transcription du gène de l'IL-6, ce qui suggérerait l'existence d'un autre facteur de transcription ou une inhibition partielle du facteur de transcription. La possible implication de ces voies dans la production d'IL-10 expliquerait le fait, car une inhibition de la production d'IL-10 provoque souvent une augmentation de la production d'IL-6.

Des expériences préliminaires ont montré que l'ajout des extraits solubles seuls ne stimulait significativement pas la production des cytokines macrophagiques (résultats non montrés). Par contre, l'ajout des extraits solubles des produits de BiolActis à des macrophages activés par le PEP a modifié les niveaux de production de l'IL-6, tel qu'il est montré dans les figures 3.6B à F. Afin de ne pas surcharger les figures par la quantité d'informations obtenues par ces expériences, nous avons présenté seulement la production additionnelle ou la diminution d'IL-6 (variations) induite par chacun des produits en présence des substances inhibitrices par rapport aux niveaux de base des cellules activées par le PEP et

les produits en présence ou non des inhibiteurs. Cette façon de faire permet de mettre en évidence les effets dus seulement à l'addition de chacun des produits de BiolActis et non pas ceux induits par le PEP. Aussi, seule la moyenne des variations dans la production d'IL-6 induits par les produits de BiolActis en présence des inhibiteurs sont présentés (ce qui explique l'absence d'écart-types sur les figures). Ainsi, la première colonne montre la quantité additionnelle d'IL-6 qui est induite par le produit de BiolActis. Une variation positive en présence d'un inhibiteur indique que le produit de BiolActis a un effet sur la production de l'IL-6 via la voie de signalisation correspondante à l'inhibiteur. Une bande près du 0 en présence d'un inhibiteur indique que la voie de signalisation n'est pas impliquée dans l'augmentation de l'IL-6 par le produit de BiolActis alors qu'une bande négative signifie que le produit de BiolActis induit un effet inhibiteur de cette voie dans la production d'IL-6.

Ainsi, la première colonne de chacune des figures 3.6 (B-F) montre que tous les extraits solubles des produits BiolActis (PC010, 16h, 48h, FB030-2 et FB036) stimulent la production d'IL-6 chez les macrophages déjà activés par le PEP. Seule l'augmentation additionnelle de l'IL-6 induite par chacun des produits est indiquée. Les effets additionnels induits par le PC010 (Fig. 3.6B) sur la production d'IL-6 dépendent du NF- κ B chez les macrophages activés au PEP. Les voies des MAPK ERK 1/2 et de la Cox-2 sont aussi impliquées mais de façon secondaire et la voie MAPK p38 n'y joue presque aucun rôle. Il est intéressant de remarquer que l'ajout du produit PC010 en présence de l'inhibiteur pour le récepteur opioïde diminue la production d'IL-6 en dessous du contrôle avec inhibiteur du récepteur opioïde.

Des résultats similaires sont observés avec les produit 16h et 48h et avec le produit FB030-2 (Figs 3.6C, 3.6D et 3.6E). Par contre, le produit 48h favorise une inhibition de la production d'IL-6 via la voie des MAPK p38 tout en montrant une plus forte stimulation par la voie de la Cox-2. D'autre part, le produit FB036 a aussi augmenté la production de l'IL-6 mais tous les inhibiteurs n'ont que partiellement inhibé cette augmentation, suggérant l'existence d'une autre voie de signalisation qui pourrait être impliquée avec ce produit (Fig. 3.6F).

3.2.4 Effets des produits de BiolActis sur la production d'IL-10 par les macrophages spléniques

En ce qui concerne l'IL-10, la figure 3.7A montre que le PEP a stimulé la production de l'IL-10 via principalement de la voie impliquant la MAPK p38 ($p < 0.001$) et, à un plus faible niveau, celle de la MAPK ERK 1/2 ($p < 0.05$). L'inhibition du facteur NF- κ B, de la COX-2 et du récepteur opioïde n'ont pas eu d'effet significatif sur la production d'IL-10 induite par le PEP. L'ajout du produit PC010 à ces macrophages a entraîné une diminution minime et non-significative de l'IL-10. Des résultats similaires sont observés avec les produits 48h, FB030-2 et FB036 (Figs 3.7C, 3.7D et 3.7E). Le produit 16h n'a pas eu d'effet significatif. Pour l'analyse des graphiques sur la production d'IL-10 en présence d'inhibiteurs, (Fig. 3.7B-F) montre que l'ajout des différents produits de BiolActis en présence des inhibiteurs a accentué la diminution de la production d'IL-10 par rapport au contrôle. Aucune des voies de signalisation étudiées ne peut être directement associée à cette diminution, car tous les inhibiteurs ont favorisé la diminution d'IL-10 causée par le produit au lieu de l'empêcher. L'approche expérimentale utilisée ne permet pas de déterminer les voies impliquées dans la diminution de l'IL-10 causée par les produits.

3.2.5 Effets des produits de BiolActis sur la production de PGE2 par les macrophages spléniques

Des expériences similaires sont réalisées pour la PGE2. Tel que montré dans la figure 3.8A, la production de PGE2 par des macrophages activés par le PEP est totalement inhibée par l'inhibiteur de la COX-2. La PGE2, par contre, n'est que partiellement inhibée par chacun des autres inhibiteurs mais est plus fortement inhibée par l'inhibiteur de la MAPK ERK ($p < 0.001$) suggérant que la production de la PGE2 est indirectement reliée à toutes les voies de signalisation étudiées. Les inhibiteurs des voies MAPK p38 et ERK provoquent une forte diminution de la production de PGE2. Tous les produits de BiolActis ont entraîné une diminution importante de la production de PGE2 par les macrophages activés par le PEP (Figs 3.8B à 3.8F). Le produit de fermentation de 16h est celui qui a entraîné la plus faible diminution de la PGE2 (Fig. 3.8C). Seuls les inhibiteurs de la MAPK p38 n'ont pas accentué

l'effet inhibiteur du produit FB036 sur la production de PGE2 (Figs 3.8F). Tous les produits inhibent la production de PGE2 par des macrophages activés par le PEP.

3.2.6 Effets immunomodulateurs de la préparation soluble de la bactérie *L. kefiranofaciens* R2C2 sur les macrophages spléniques

Les résultats obtenus avec les extraits solubles provenant du lactosérum fermenté durant 48 heures par la souche R2C2 avant et après extraction de cellules bactériennes suggèrent que la bactérie R2C2 pourrait posséder des propriétés immunomodulatrices différentes de celles des préparations solubles des MPMss. Nous avons alors vérifié cette hypothèse en étudiant les propriétés immunomodulatrices d'un extrait soluble de la bactérie R2C2. L'extrait de la bactérie R2C2 a induit la production d'IL-6 et d'IL-10 à des dilutions de 1/10 et 1/100 principalement (Figs 3.9A et 3.9C) ($p < 0.01$ à 0.001). En présence d'inhibiteurs des MAPK p38 et ERK ainsi que du NF- κ B, la production d'IL-6 n'a pas été diminuée alors que celle de l'IL-10 est fortement inhibée par les deux inhibiteurs MAP kinases pour P38 et ERK1/2 (Figs 3.9 B et 3.9 D).

3.2.7 Résumé des effets immunomodulateurs des produits BiolActis

En comparant les effets des différents produits de fermentation de lactosérum et la bactérie R2C2 sur la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires par les macrophages de souris C57BL/6 activés par le PEP, il apparaît que les différentes préparations de BiolActis montrent des effets assez similaires. Ces produits diminuent la production de PGE2 induit par le PEP chez les macrophages de la souris C57BL/6 et ce via les voies des MAPK p38 et ERK en plus de la voie de la Cox-2. Les produits n'affectent que peu la production d'IL-10 lorsque celle-ci est induite par le PEP alors qu'ils augmentent la production d'IL-6 via les voies NF- κ B et Cox-2 principalement (alors que la voie de la MAPK p38 et des récepteurs opioïdes auraient plutôt un effet inhibiteur). Ces observations suggèrent que plus d'une substance présente dans les extraits modulerait ces voies de signalisation, que plusieurs récepteurs sont probablement stimulés en même temps et que les effets observés sont la résultante des actions de ces multiples substances.

3.3 Propriétés immunomodulatrices des MPMs administrés simultanément chez des animaux dans un modèle de colite expérimentale induite par le sulfate de dextran sodium

Les résultats antérieurs obtenus par BiolActis avaient montré que l'administration de MPM et de la bactérie *L. kefiranofaciens* R2C2 diminuait les symptômes de la colite expérimentale induite avec une solution de DSS à 3%. Comme l'objectif commercial des MPMs de BiolActis (contenant la partie soluble et des bactéries) cible le contrôle des inflammations gastro-intestinales légères, nous avons réalisé des expériences pour tester l'efficacité anti-inflammatoire *in vivo* des produits de BiolActis en utilisant le modèle de colite expérimentale aigue modérée induite par le DSS. Ainsi, nous avons traité simultanément des groupes de 4 souris C57BL/6 avec 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage et avec des MPMs à une dose de 100 μ L par 20 g (poids) par gavage oral quotidien. L'administration de DSS a été arrêtée après 6 jours alors que l'administration des MPMs s'est prolongée durant 4 jours additionnels. Les animaux ont été euthanasiés au 10^e jour, soit 4 jours après l'arrêt du DSS. Plusieurs paramètres cliniques et immunologiques ont alors été analysés tout au long des traitements et dans les tissus intestinaux suite à l'euthanasie.

3.3.1 Évolution du poids et des signes cliniques des animaux

La figure 3.10A montre l'évolution des poids moyens des souris non-traitées, de celles ayant reçu du DSS seulement et de celles ayant reçu du DSS et traitées avec le MPM. Les écarts types ne sont pas affichés sur ce graphique, car ils se recouvraient tous sur un large intervalle de plus ou moins 1 g. Autrement dit, la variation de poids entre les souris d'un même groupe ne permet pas d'évaluer s'il y a une différence significative par rapport au groupe contrôle. L'affichage de ces écarts type aurait rendu le graphique illisible et n'aurait pas apporté d'information pertinente supplémentaire. L'évaluation du poids moyen des souris est donc une analyse qualitative de la tendance générale observée pour le poids moyen des souris de chaque groupe. La courbe montre une augmentation graduelle du poids chez les souris contrôle. L'administration d'une dose modérée de DSS a entraîné une légère baisse de poids dans les premiers jours, suivi d'une remontée temporaire et ensuite d'une perte importante de poids. Cette perte de poids semble commencer à se corriger 4 jours après la

cessation du traitement. Par contre, les souris traitées avec le DSS et ayant reçu des MPMs ont montré un gain de croissance rapide dans les premiers jours, gain qui s'est stabilisé à un niveau supérieur à celui observé chez les souris n'ayant reçu que du DSS avant d'entreprendre une remontée vers le 10^e jour. Ces résultats indiquent que l'administration de MPM a donné non seulement un gain de poids mais a aussi contrôlé la perte de poids induite par le DSS. Ainsi, lors de l'euthanasie après 10 jours, les poids corporels des souris des trois groupes étaient devenus relativement similaires (Fig. 3.10B) et aucune différence significative dans le poids n'a été observée entre les différents groupes.

La colite expérimentale aigüe induite par le DSS peut entraîner des pertes sanguines ou des hémorragies intestinales créant une anémie chez l'animal. Les travaux antérieurs de BiolActis avaient montré que les MPMs et la bactérie R2C2 avaient diminué les pertes sanguines et l'anémie consécutive. Nous avons alors vérifié si l'administration de DSS à 2,5% entraînait une anémie et, si oui, quels étaient les bénéfices d'une administration des MPMs sur ce paramètre. L'analyse de l'hématocrite (Fig. 3.11) a révélé que la concentration de DSS utilisé n'a pas entraîné d'anémie tout au long du traitement et que l'addition des MPMs n'a eu aucun impact négatif sur l'hématocrite des animaux. De plus, aucun méléna (évacuation par l'anus de sang noir, pâteux et nauséabond mélangé ou non aux selles) n'a été constaté chez ces animaux durant toute la durée des expériences.

3.3.2 Effets des MPMs sur l'inflammation intestinale induite par le DSS

Le DSS induit une inflammation intestinale qui peut se mesurer par la variation du poids du côlon. Ainsi, les souris ont été euthanasiées après 10 jours et les côlons ont été prélevés et pesés. Tel que montré dans la figure 3.12A, l'administration de DSS a augmenté le poids du côlon des souris ($p < 0.01$) même chez celles ayant reçu les MPMs. Le poids de l'animal peut influencer le poids total du côlon. Lorsque les résultats sont comparés au poids de l'animal, cet effet demeure significatif (Fig. 3.12B) ($p < 0.05$).

L'inflammation implique la production de cytokines inflammatoires et aussi anti-inflammatoires. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et l'IL-6 et anti-

inflammatoires IL-10 et PGE2 ont été dosées dans des extraits solubles du côlon. Tel qu'attendu, le TNF- α et l'IL-6 ont été fortement augmentés par l'administration du DSS (Figs 3.13A et C) ($p < 0.01$ à 0.001). L'administration des MPMs a légèrement diminué le niveau de TNF- α sans que cette diminution soit statistiquement significative comparée au niveau de TNF- α des souris traitées seulement avec le DSS, quoique dans ce groupe, la variation individuelle était assez importante. Aussi, les souris traitées avec le DSS ont montré une augmentation importante d'IL-10 ($p < 0.001$) ainsi que celles ayant reçu des MPMs ($p < 0.001$) (Fig. 3.13B). Par contre, les MPMs ont légèrement diminué la production de PGE2 par les souris traitées avec le DSS (Fig. 3.13D) ($p < 0.05$).

3.3.3 Effets des MPMs sur les différentes populations lymphocytaires des tissus lymphoïdes intestinaux lors d'inflammation intestinale induite par le DSS

Les tissus lymphoïdes intestinaux comprennent les plaques de Peyer, les cellules lymphoïdes de la lamina propria et celles dans la couche épithéliale intestinale. Les proportions entre les différentes sous-populations lymphocytaires varient selon la fonction de chacun de ces tissus et reflètent l'équilibre entre l'état de tolérance intestinal et celui induit par une inflammation puisque la tolérance implique principalement une plus forte proportion de cellules T régulatrices (FoxP3) pouvant produire de l'IL-10. Afin de vérifier les effets des MPMs sur l'équilibre des populations lymphocytaires tolérantes et inflammatoires, les lymphocytes de ces différents tissus sont isolés à partir du côlon et l'intestin grêle de chaque animal et soumis à plusieurs doubles et triples immunomarquages avec des anticorps fluorescents spécifiques à différents marqueurs CD4, CD8, FoxP3, TCR $\gamma\delta$, NK et CD19 définissant des sous-populations lymphocytaires, et ensuite, analysés par cytofluorométrie.

Dans les plaques de Peyer, seul le pourcentage des lymphocytes B (CD19) ont été diminué par l'administration du DSS ($p < 0.05$) (Fig. 3.14). Par contre, le traitement des souris par les MPMs a compensé cette diminution du pourcentage des lymphocytes B et a légèrement augmenté celui des lymphocytes CD4 $^{+}$ et des lymphocytes CD8 $^{+}$ ($p < 0.05$).

L'analyse des sous-populations lymphocytaires intra-épithéliales a été plus détaillée grâce à la quantité de cellules qu'il est possible d'extraire. Ainsi, aucune différence dans les pourcentages de lymphocytes CD4+ n'a été mise en évidence dans ce tissu entre les animaux de chacun des groupes suite à deux différents triples immunomarquages (Figs 3.15 A et B). Une augmentation du pourcentage des lymphocytes CD8+ est apparue chez les animaux ayant été traités avec le DSS seulement et ce, par deux triples marquages différents (Figs 3.15 A et B) ($p < 0.05$). Par contre, l'administration de MPM a diminué l'augmentation du pourcentage de lymphocytes CD8+ induit par le DSS, ce qui apparaît plus clairement dans la figure 3.15A.

La présence de lymphocytes T régulateurs ayant des fonctions suppressives a été vérifiée par le marquage du facteur FoxP3. Tel que montré dans la figure 3.15B, l'administration du DSS a entraîné une légère baisse du pourcentage de ces cellules quoiqu'à un niveau non significatif dû à la forte variation individuelle observée chez les souris contrôles. D'autre part, le pourcentage des lymphocytes TCR $\gamma\delta$, une autre population de lymphocytes généralement suppressifs, a été légèrement augmenté par le DSS ($p < 0.05$) mais cette augmentation a été inhibée par le traitement avec les MPMs (Fig. 3.15A). Le traitement avec les MPMs a augmenté le pourcentage de cellules doubles positives (CD4+CD8+) ($p < 0.01$) et a contrecarré la baisse du pourcentage des cellules CD8+TCR $\gamma\delta$ + induite par le DSS ($p < 0.05$) (Fig. 3.15C). Finalement, le pourcentage des cellules NK n'a pas été réellement altérés par la colite expérimentale mais l'administration de MPM a fortement augmenté le pourcentage de lymphocytes B dans les tissus intraépithéliaux, tel que montré par le marqueur CD19 ($p < 0.01$) (Fig. 3.15D). L'absence du groupe contrôle MPM ne permet pas pour le moment d'attribuer l'effet observé au DSS ou aux MPMs.

Les sous-populations lymphocytaires de la lamina propria ont été analysées de façon similaire. La figure 3.16 montre que le traitement par le DSS n'a pas significativement augmenté le pourcentage de lymphocytes CD4 dans ce tissu alors que l'administration de MPM a fortement diminué ce pourcentage, tel qu'observé par deux triples immunomarquages différents ($p < 0.05$ à 0.001) (Figs 3.16A et B).

Les pourcentages des lymphocytes CD8+ ainsi que ceux des lymphocytes T régulateurs (FoxP3+) n'ont pas été modifiés. Par contre, le traitement par les MPMs a légèrement augmenté le pourcentage des lymphocytes TRC $\gamma\delta$ + ($p < 0.05$) (Fig. 3.16A). Cette augmentation du pourcentage des cellules TCR $\gamma\delta$ + résultait de l'augmentation du pourcentage de la sous-population TCR $\gamma\delta$ + CD4+ ($p < 0.01$) (Fig. 3.16C). D'autre part, une chute importante du pourcentage des lymphocytes B (CD19) a été provoquée par le DSS ($p < 0.001$) alors que l'administration des MPMs a complètement compensé cet effet inhibiteur (Fig. 3.16D).

3.4 Propriétés immunomodulatrices des MPMs et de la bactérie *L. kefiranofaciens* R2C2 administrés préventivement chez des animaux dans un modèle de colite expérimentale induite par le DSS

Une seconde série d'expériences *in vivo* sur les propriétés immunomodulatrices des MPMs et de la bactérie *L. kefiranofaciens* R2C2 a été effectuée afin d'évaluer les effets de l'administration de ces produits par voie orale dans un contexte de prévention des désordres inflammatoires intestinaux. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de la bactérie R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral quotidien durant 15 jours. Des groupes de 6 souris traités avec les MPMs ou la bactérie R2C2 ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du 7^e jour et jusqu'au 14 jour de l'expérience. Des souris contrôles ont reçu des volumes équivalents d'eau par voie orale.

3.4.1 Évolution du poids et des signes cliniques chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou la bactérie R2C2 dans le modèle de colite intestinale induite par le DSS

La figure 3.17 montre l'évolution des poids moyens des souris non-traitées, des souris ayant reçu du DSS seulement, des souris ayant reçu le MPM ou R2C2 et des souris ayant reçu le MPM ou R2C2 avant et pendant l'administration de DSS. Les écarts type (SD) ne sont pas affichés sur ce graphique, car ils se recouvraient tous sur un large intervalle de plus ou moins 1 g. Autrement dit, la variation de poids entre les souris d'un même groupe ne permet

pas d'évaluer s'il y a une différence significative par rapport au groupe contrôle, sauf pour le groupe R2C2+DSS. L'affichage de ces écarts type aurait rendu le graphique illisible et n'aurait pas apporté d'information pertinente supplémentaire. L'évaluation du poids moyen des souris est donc une analyse qualitative de la tendance générale observée pour le poids moyen des souris de chaque groupe. La figure 3.17 montre que les gains de poids sont graduels chez les souris n'ayant reçu que de l'eau par gavage. L'administration de la bactérie R2C2 a favorisé une légère augmentation graduelle du gain de poids, quoiqu'à un niveau non statistiquement significatif. L'ajout de MPM n'a pas entraîné d'augmentation de gain de poids au cours de l'expérience. L'administration du DSS à 2.5% à partir du 7^e jour a favorisé une perte de poids qui s'est accentuée après 5 jours d'administration (12^e jour de l'expérience). L'administration du DSS à des animaux déjà traités avec les MPMs ou avec la bactérie R2C2 a entraîné une perte de poids plus forte que chez les animaux n'ayant pas reçu ces produits à partir du 14^e jour. La perte de poids a été encore plus forte chez les souris ayant reçu la bactérie R2C2 ($p < 0.05$, 0.01)

L'analyse de l'hématocrite a révélé que seulement les souris traitées avec le DSS au 14^e jour de l'expérience (correspondant à 7 jours d'administration de DSS) ont montré une baisse significative de l'hématocrite ($p < 0.01$) (Fig. 3.18). L'addition de MPM ou de la bactérie R2C2 a corrigé l'anémie induite par le DSS détectable après 14 jours. Ces résultats diffèrent de ceux de la première expérience par le moment du traitement aux MPM qui était antérieur de 7 jours à celui de l'administration du DSS dans la seconde expérience.

3.4.2 Effets sur le niveau d'inflammation et sur la production de cytokines de l'administration préventive de MPM ou de la bactérie R2C2 dans le modèle de colite intestinale induite par le DSS

Afin d'évaluer le niveau d'inflammation du côlon, ces derniers ont été lavés et pesés. Les résultats présentés dans la figure 3.19 indiquent que clairement que l'inflammation du côlon a été plus importante chez les animaux ayant reçu des MPMs ou la bactérie R2C2 lorsque traités après 7 jours avec du DSS pour 7 jours additionnels ($p < 0.01$).

D'autre part, l'analyse des différentes cytokines dans des extraits de côlon par des tests ELISA a révélé que tous les traitements ont entraîné la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α (Figs 3.20A et C). Les plus fortes augmentations d'IL-6 ont été induites par le DSS et les traitements avec les MPMs et la bactérie R2C2 n'ont pas corrigé cette augmentation (Fig. 3.20A) ($p < 0.05$ à 0.01). Le MPM et non la bactérie R2C2, par contre, a entraîné la production accrue de TNF- α chez des souris ayant reçu de DSS, suggérant un effet additif avec le DSS ($p < 0.01$ à 0.001) (Fig. 3.20C). Les MPMs seuls se sont avérés d'excellents inducteurs d'IL-10 après 15 jours d'administration mais cette augmentation a diminuée en présence de DSS ($p < 0.01$) (Fig. 3.20B). La bactérie R2C2 a favorisé une légère augmentation d'IL-10 en présence d'une colite induite par DSS ($p < 0.01$). La présence de MPM et de bactérie R2C2 a aussi augmenté légèrement la production de PGE2 déclenchée par le DSS ($p < 0.05$) (Fig. 3.20 D) ($p < 0.05$).

3.4.3 Effets de l'administration préventive des MPMs et de la bactérie R2C2 sur les différentes populations lymphocytaires des tissus lymphoïdes intestinaux lors d'inflammation intestinale induite par le DSS

Comme pour la série d'expériences précédentes, les lymphocytes ont été isolés des plaques de Peyer, de la lamina propria et du tissu épithélial. Les différentes sous-populations lymphocytaires ont été identifiés par immunomarquage avec des anticorps contre les marqueurs CD4, CD8, FoxP3, TCR $\gamma\delta$, IL-17A, NK1.1 et CD19 (lymphocytes B) selon des techniques de doubles ou triples marquages, et analysés en cytofluorométrie.

3.4.4 Les populations lymphocytaires des plaques de Peyer

Dans les plaques de Peyer, peu de variations significatives ont été mises en évidence dans les pourcentages des sous-populations de lymphocytes CD4+, CD8+ ou double positives CD4+CD8+, sauf une légère augmentation du pourcentage des CD4+CD8+ chez des souris ayant reçu seulement la bactérie R2C2 ($p < 0.05$) (Fig. 3.21C).

Le pourcentage de lymphocytes B (CD19) a diminué chez les souris traitées avec la bactérie R2C2 et celles traitées avec les MPMs et la bactérie R2C2 suivie du DSS ($p < 0.05$ et 0.01) (Fig. 3.22A). Le pourcentage de cellules NK a légèrement augmenté chez les souris des groupes R2C2 et MPM avec DSS ($p < 0.05$) (Fig. 3.22B). Cette augmentation, quoique peu significative, se répercute sur une population CD19+NK1.1+ qui est apparue en quantité détectable dans les extraits cellulaires de tous les animaux, surtout pour le groupe R2C2 avec DSS ($p < 0.05$) (Fig. 3.22C).

Devant ces résultats, une analyse particulière a été ajoutée, celle d'une nouvelle sous-population lymphocytaire impliquée dans la réponse inflammatoire, les lymphocytes CD4+IL-17+. Nous avons observé que les MPMs diminuaient ces cellules alors que la bactérie R2C2 les augmentait fortement en présence de DSS ($p < 0.05$ et 0.001) (Fig. 3.23A).

L'analyse des populations de lymphocytes TCR $\gamma\delta$ + a montré une augmentation du pourcentage de ces cellules, particulièrement des CD8+TCR $\gamma\delta$ + en relation avec le niveau d'inflammation. Ainsi, les plus hauts niveaux de cellules étaient observés chez les souris ayant reçu la bactérie R2C2 seule et aussi chez les souris ayant reçu des MPMs ou la bactérie R2C2 et traitées avec DSS ($p < 0.05$ à 0.001) (Fig. 3.23B).

3.4.5 Les populations lymphocytaires intraépithéliales

Les effets des divers traitements sur les lymphocytes intraépithéliaux ont entraîné des changements notables chez plusieurs sous-populations lymphocytaires. Le traitement avec le DSS a diminué les pourcentages des lymphocytes CD4+ et CD8+ ($p < 0.05$) (Figs 3.24 A et B). Les traitements avec les MPMs et la bactérie R2C2 ont plutôt favorisé une augmentation du pourcentage des CD4+ et des CD8+, respectivement, surtout chez les souris traitées avec le DSS ($p < 0.05$ et 0.01) (Figs 3.24A et B). Le pourcentage des lymphocytes CD4+CD8+ a été légèrement augmenté par les MPMs en présence du DSS ($p < 0.05$) (Fig. 3.24C).

Aussi, tous les traitements ont provoqué une diminution du pourcentage des lymphocytes B, particulièrement chez les souris ayant reçu la bactérie R2C2 ($p < 0.05$ à 0.001)

(Fig. 3.25A). Ces diminutions sont faites à l'avantage des cellules NK1.1 et des cellules CD19+NK1.1+ particulièrement chez les souris traitées avec les MPMs ou la bactérie R2C2 en présence de DSS ($p < 0.05$ à 0.001) (Figs 3.25 B et C).

Le traitement avec les MPMs a augmenté le pourcentage des lymphocytes intraépithéliaux CD4+IL-17+ plus fortement que la bactérie R2C2, mais la présence du DSS a bloqué ces augmentations ($p < 0.05$ et 0.01) (Fig. 3.26A). Aussi, les MPMs ont favorisé l'augmentation du pourcentage de lymphocytes T régulateurs (FoxP3+) en présence du DSS ($p < 0.001$) alors que ce dernier provoquait plutôt une diminution du pourcentage de ces cellules ($p < 0.05$) (Fig. 3.26B). Par contre, cette augmentation reflétait non seulement une légère hausse du pourcentage des lymphocytes FoxP3+ CD8+ ($p < 0.01$) mais surtout d'une autre population de cellules FoxP3 n'exprimant ni le CD4, ni le CD8. Finalement, le traitement avec la bactérie R2C2 a favorisé l'augmentation du pourcentage des lymphocytes TCR $\gamma\delta$ + ($p < 0.01$ et 0.001) et ce, même en présence du DSS qui seul, entraînait plutôt une diminution du pourcentage de ces cellules ($p < 0.05$ et 0.01) (Fig. 3.26C).

3.4.6 Les populations lymphocytaires de la lamina propria

Au niveau de la lamina propria, l'administration de DSS a entraîné une diminution du pourcentage des lymphocytes CD4+ et CD8+ ($p < 0.001$) (Figs 3.27A et B). Ces effets ont été moindres chez les animaux ayant préventivement reçu des MPMs ou la bactérie R2C2 en présence de DSS, surtout pour les cellules CD4+, moins pour les CD8+ (Fig. 3.27B). Les lymphocytes doubles positifs (CD4+CD8+) n'ont pas été significativement affectés ($p < 0.01$ et 0.001) (Fig. 3.27C).

Le traitement avec le DSS a entraîné une forte baisse du pourcentage des lymphocytes B (CD19) chez les souris traitées seulement avec ce produit ($p < 0.001$) (Fig. 3.28A). Les MPMs seuls ont augmenté fortement le pourcentage de la population cellulaire CD19+ ($p < 0.001$). La diminution de ces cellules est moindre chez les groupes ayant préalablement reçu des MPMs ou la bactérie R2C2 ($p < 0.01$ et 0.05) (Fig. 3.28A). Les MPMs se sont avérés d'excellent

stimulateurs des cellules CD19+NK1.1+ ($p < 0.05$ et 0.001) (Fig. 3.28C) alors que les variations des cellules NK1.1+ n'étaient pas significatives (Fig. 3.28B).

Les MPMs ont encore montré une capacité à augmenter le pourcentage des lymphocytes CD4+IL-17+ ($p < 0.001$) supérieure à celle induite par le DSS ($p < 0.05$ et 0.01) mais tout en diminuant en présence de DSS (Fig. 3.29A). Le traitement avec la bactérie R2C2 n'a pas été capable de contrer l'augmentation du pourcentage de ces cellules par le traitement avec le DSS même si la bactérie R2C2 n'avait aucun effet stimulateur chez cette population lymphocytaire. D'autre part, les MPMs et la bactérie R2C2 ont montré une certaine capacité à augmenter le pourcentage des cellules T régulatrices (FoxP3+) de la lamina propria ($p < 0.05$) alors que le traitement au DSS chez ces souris entraînait la chute du pourcentage de ces cellules ($p < 0.05$) (Fig. 3.29B). Les pourcentages des sous-populations lymphocytaires TCR $\gamma\delta$ + de la lamina propria ont été augmentés par les MPMs et la bactérie R2C2 alors que le DSS favorisait plutôt leur diminution ($p < 0.05$ et 0.01) (Fig. 3.29C). Par contre, les traitements préventifs avec les MPMs et la bactérie R2C2 ont empêché la baisse de cette population induite par le DSS.

3.4.7 Effets de l'administration préventive des MPMs et de la bactérie R2C2 sur la production d'IL-23 et d'IL-17 lors d'inflammation intestinale induite par le DSS

Devant les résultats concernant la population CD4+IL-17+, nous avons décidé de vérifier les niveaux de production des cytokines IL-17 et IL-23 produites dans le côlon de tous ces groupes de souris. Compte tenu de la non-disponibilité de tests ELISA pour ces cytokines dont l'importance vient d'être récemment reconnue dans les désordres inflammatoires, nous avons alors développé une méthode de dosage qualitatif par RT-PCR en temps réel à partir de l'ARN extrait du côlon. Tel que montré dans la figure 3.30, l'administration des MPMs et de la bactérie R2C2 a stimulé la production de l'IL-23, ce qui a entraîné la production de l'IL-17 ($p < 0.001$). Le traitement au DSS n'a pas stimulé ces cytokines mais a interféré dans la production de l'IL-23 et a entraîné une diminution de la production de l'IL-17 chez les souris préventivement traitées avec les MPMs ($p < 0.05$) ou surtout avec la bactérie R2C2.

Tous ces résultats montrent que l'administration des MPMs et/ou de la bactérie R2C2 induits des changements inflammatoires autant au niveau des cytokines que de certaines populations lymphocytaires, mais ces changements ont relativement peu d'effets sur le niveau d'inflammation intestinale. Par contre, lors d'une inflammation intestinale provoquée par le DSS, les effets de l'administration de ces produits dépendent du moment d'administration de ces produits, soit avant le traitement avec le DSS, soit après l'induction de l'inflammation par le DSS.

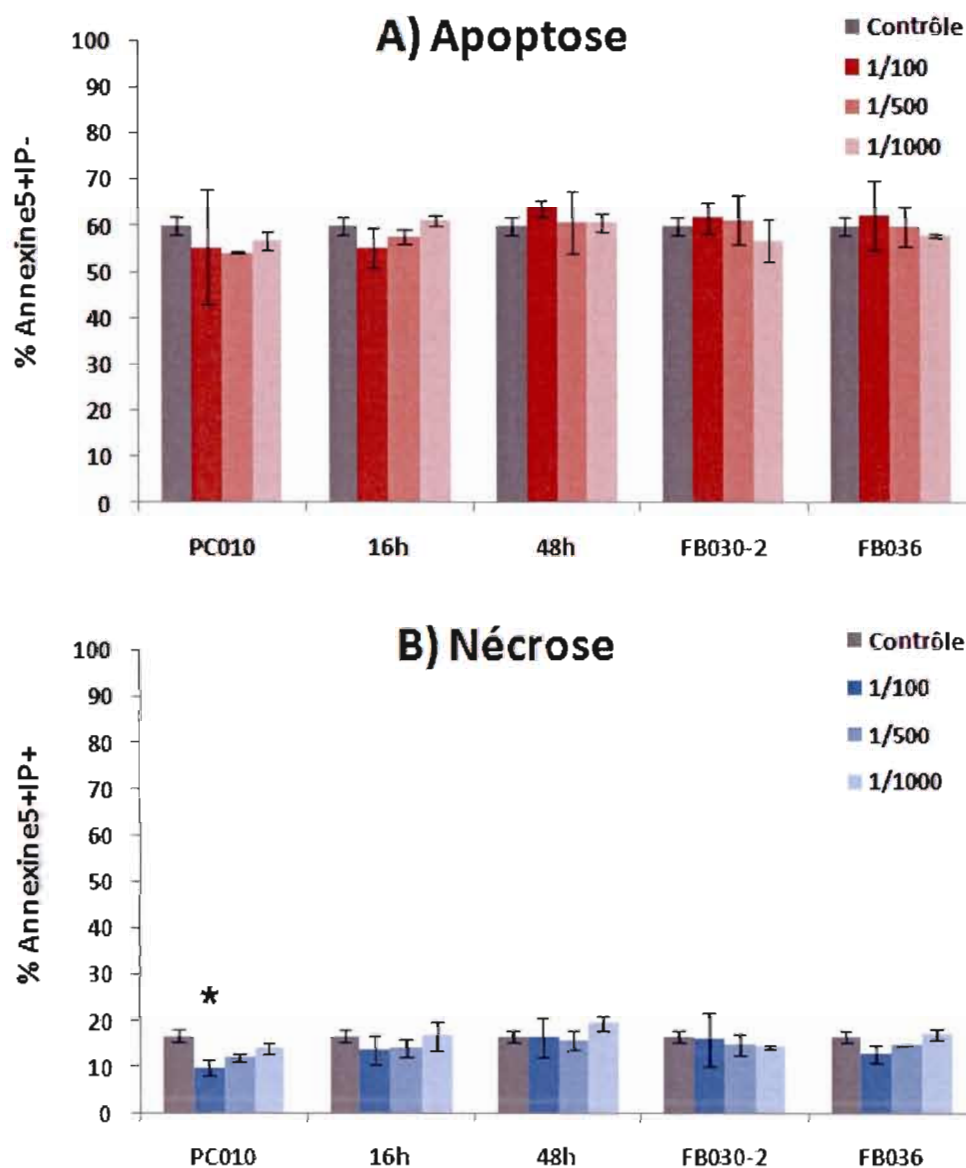


Figure 3.1: Cytotoxicité des produits BiolActis sur les cellules Caco-2. Les pourcentages d'apoptose (Annexine5+IP-)(A) et de nécrose (Annexine5+IP+)(B) sont évalués chez des cellules Caco-2 suite à une incubation de 24 h en présence des produits solubles de BiolActis résultant de différentes conditions de fermentation. Les cellules Caco-2 sont mises en culture à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules/mL durant 48 h. Les produits BiolActis sont ajoutés à ces cellules pour une période de 24 h, les cellules sont marquées avec de l'iodure de propidium (IP) et à l'Annexine 5 et analysées par cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux expériences et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p \leq 0.05$).

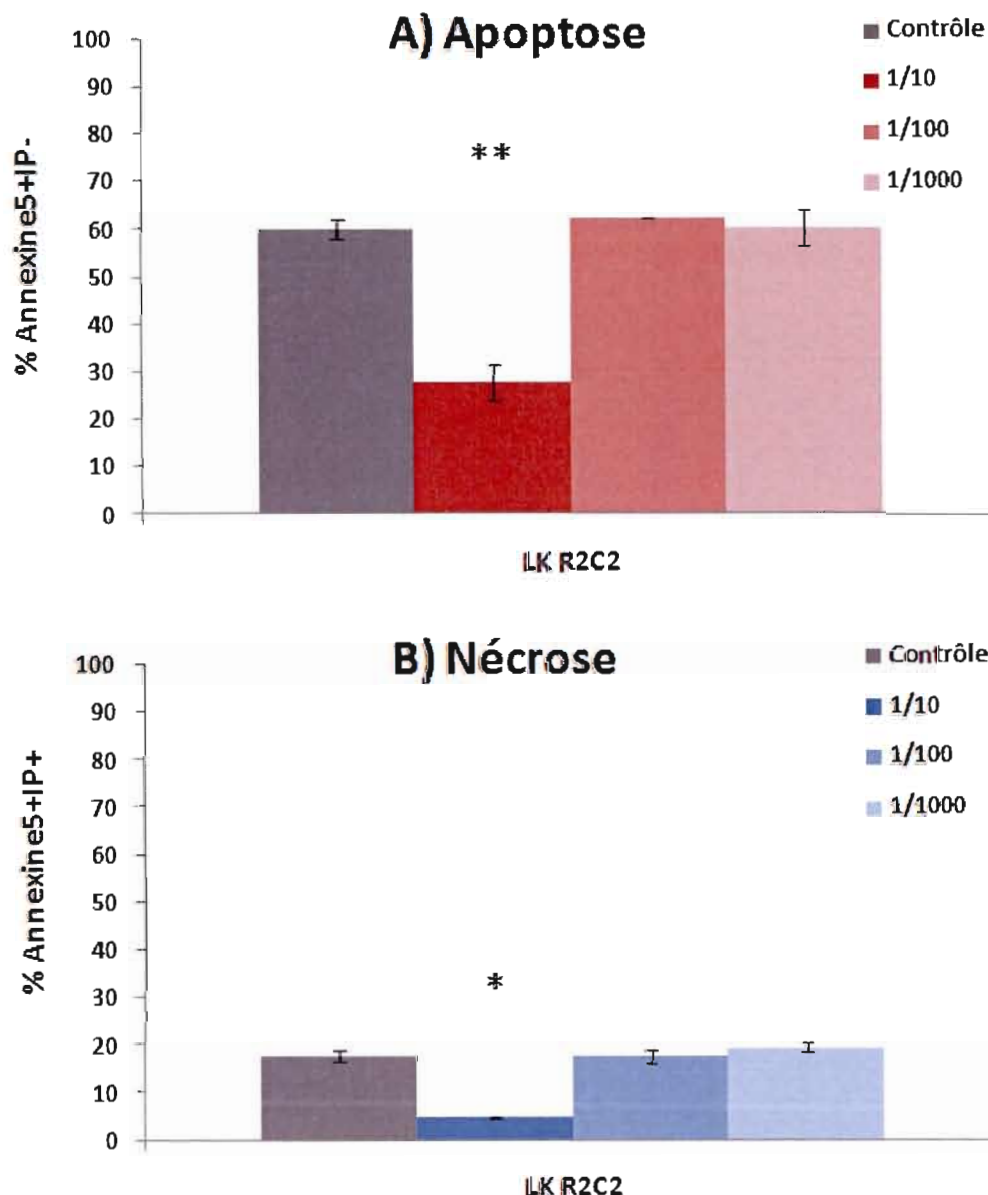


Figure 3.2: Cytotoxicité de *L. kefiranofaciens* R2C2 sur les cellules Caco-2. Les pourcentages d'apoptose (Annexine5+IP-)(A) et de nécrose (Annexine5+IP+)(B) sont évalués chez des cellules Caco-2 suite à une incubation de 24 h en présence de différentes dilutions de la suspension de la souche bactérienne *L. kefiranofaciens*. Les cellules Caco-2 sont mises en culture à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules/mL durant 48 h. Les suspensions bactériennes pasteurisées ont été ajoutées à ces cellules pour une période de 24 h, les cellules sont marquées avec de l'iodure de propidium (IP) et à l'Annexine 5 et analysées par cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux expériences et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

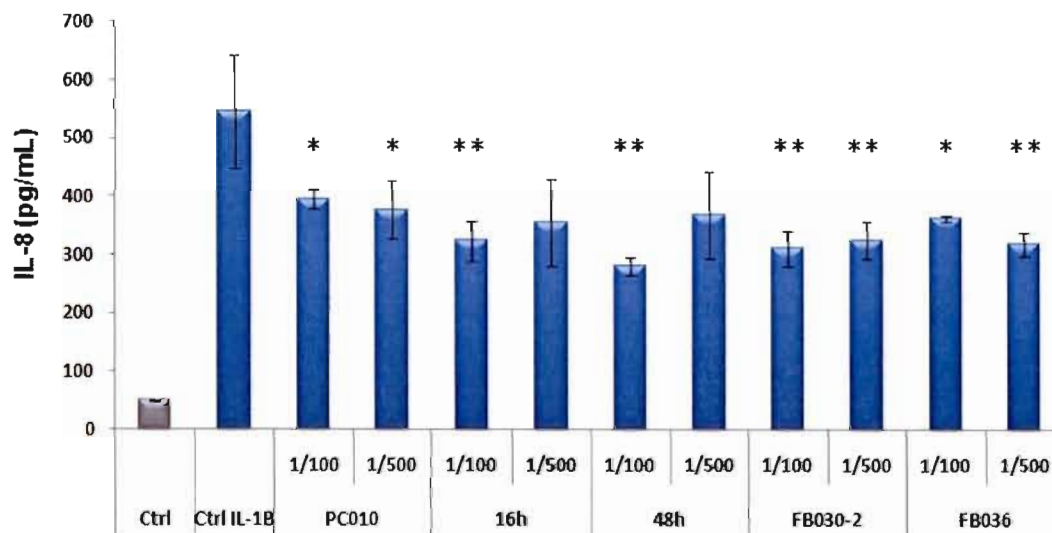


Figure 3.3: Effet des produits BiolActis sur la production d'IL-8 par les cellules Caco-2 stimulées avec de l'IL-1 β . Les cellules Caco-2 sont mises en culture à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules/mL/puit durant 48 h. Le milieu de culture des cellules Caco-2 est remplacé par un milieu sans sérum contenant 32 ng/mL d'IL-1 β humaine. Les produits solubles de BiolActis sont ajoutés 1 h plus tard. Les surnageants sont recueillis après 24 h d'incubation et l'IL-8 est dosée par un test ELISA. Les résultats sont représentatifs de deux expériences et le test statistique effectué est le test t de Student en comparaison avec le Ctrl IL-1 β (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

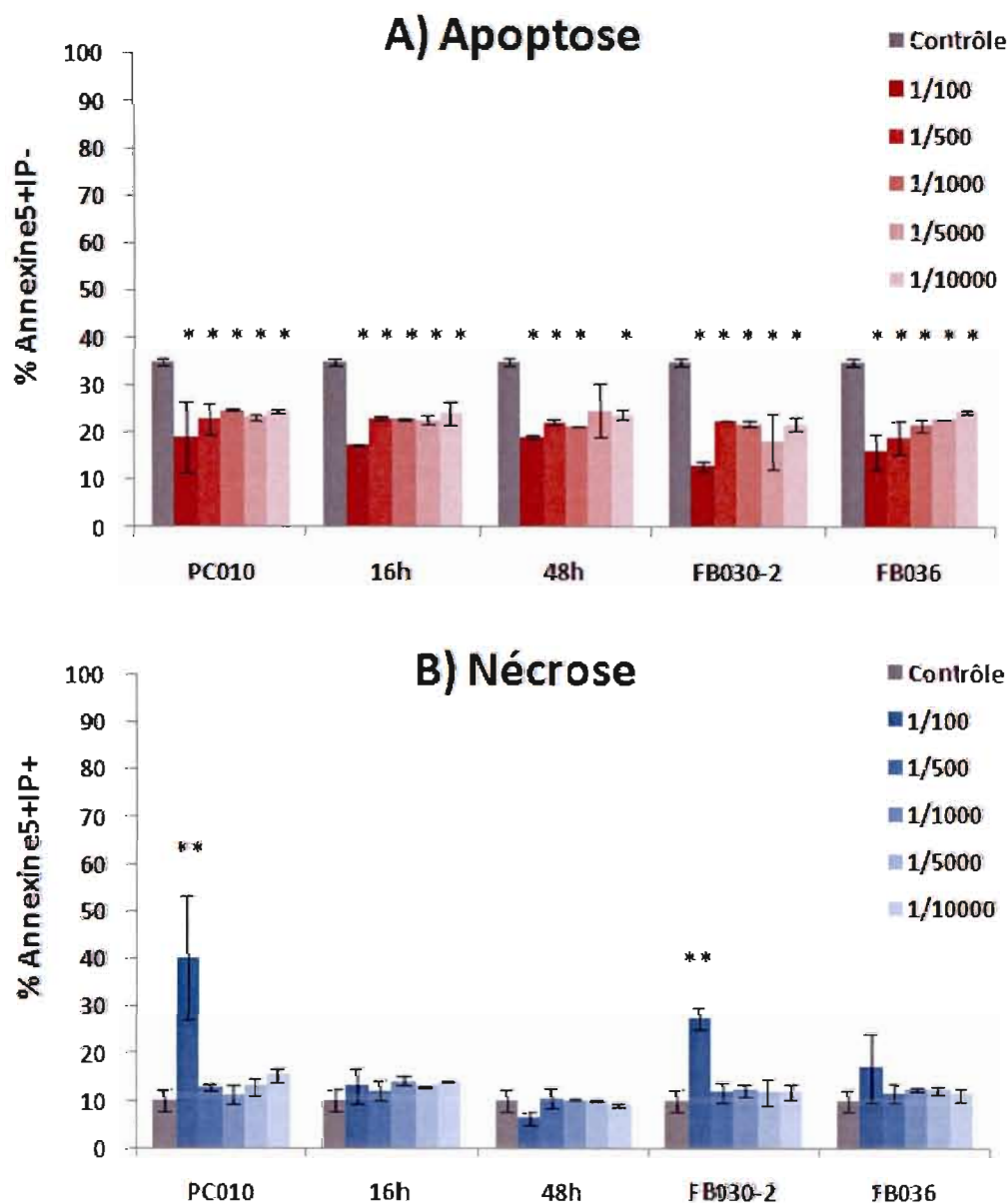


Figure 3.4: Cytotoxicité des produits BiolActis sur les splénocytes de souris C57BL/6. Les pourcentages d'apoptose (Annexine5+IP-)(A) et de nécrose (Annexine5+IP+)(B) sont évalués chez des cellules spléniques de souris C57BL/6 suite à une incubation de 24 h en présence des produits solubles de BiolActis résultant de différentes conditions de fermentation. Les cellules sont mises en culture à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules/mL durant 48 h. Les produits BiolActis sont ajoutés à ces cellules pour une période de 24 h, les cellules sont marquées avec de l'iodure de propidium (IP) et à l'Annexine 5 et analysées par cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux expériences et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

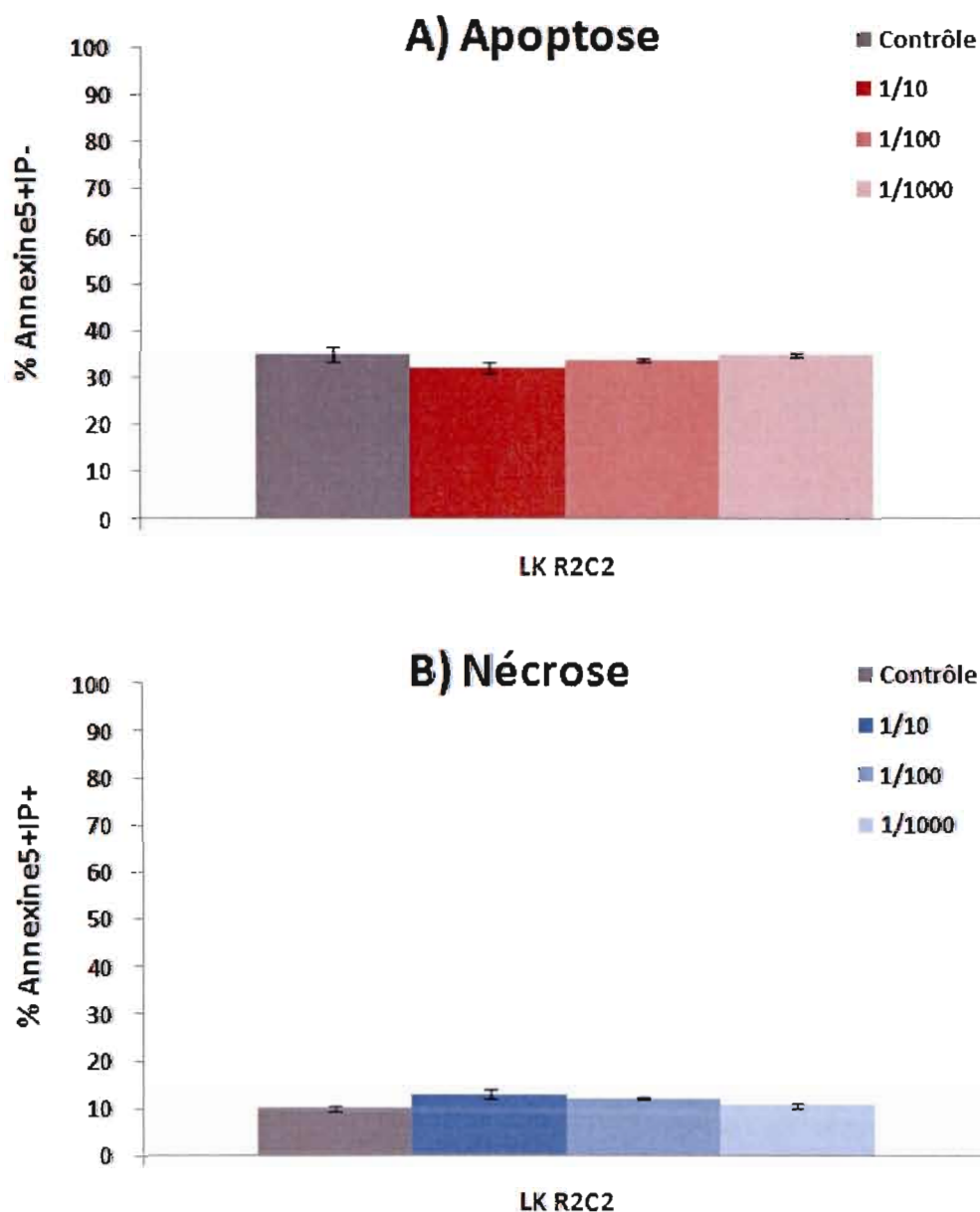


Figure 3.5: Cytotoxicité de *Lactobacillus kefiranofaciens* R2C2 sur les splénocytes de souris C57BL/6. Les pourcentages d'apoptose (Annexine5+IP-)(A) et de nécrose (Annexine5+IP+)(B) sont évalués chez des cellules spléniques de souris C57BL/6 suite à une incubation de 24 h en présence de différentes dilutions de la suspension de la souche bactérienne *L. kefiranofaciens*. Les cellules Caco-2 sont mises en culture à raison de $2,5 \times 10^5$ cellules/mL durant 48 h. Les suspensions bactériennes pasteurisées sont ajoutées à ces cellules pour une période de 24 h, les cellules sont marquées avec de l'iodure de propidium (IP) et à l'Annexine 5 et analysées par cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux expériences et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p \leq 0.05$).

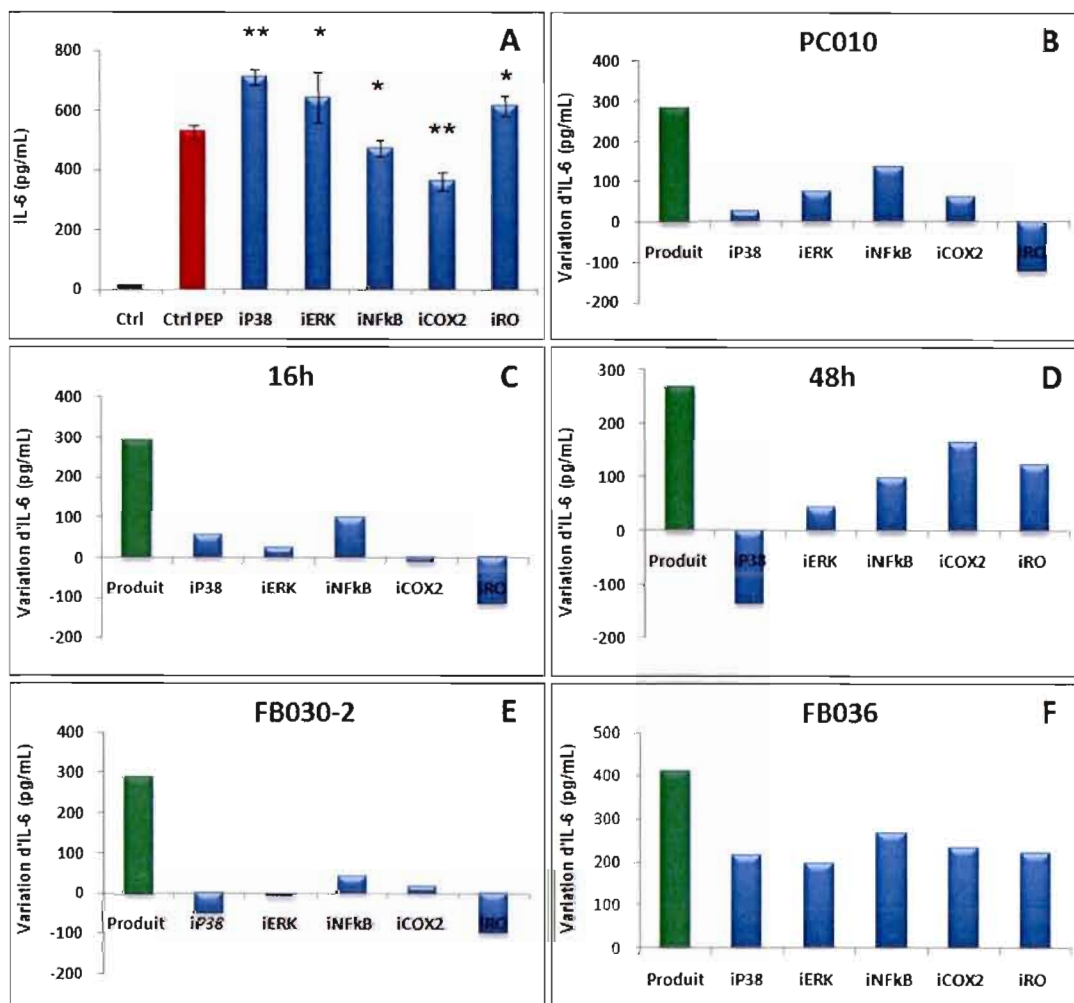


Figure 3.6: Modifications dans la production d'IL-6 par les macrophages de souris C57BL/6 traités par le peptidoglycane et différents produits BiolActis, en présence ou en absence d'inhibiteurs spécifiques. Les macrophages ($2,5 \times 10^5$) de rate de souris C57BL/6 sont isolés par adhérence. Les macrophages sont stimulés avec du peptidoglycane (10 ug/mL) durant 2 h, les différents inhibiteurs y sont ajoutés pour une durée de 1 h avant l'ajout des différents produits de BiolActis (dilution 1/500). Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂. Les surnageants sont récoltés après 24 h et l'IL-6 est dosée par un test ELISA. Les différents inhibiteurs sont U0126 (iERK), SN-50 (iNFkB), SB203580 (iP38), COX-2 Inhibitor II (iCOX2) et Naltrexone (iRO). Les résultats sont représentatifs de deux expériences et le test statistique effectué est le test t de Student en comparaison avec le Ctrl PEP (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

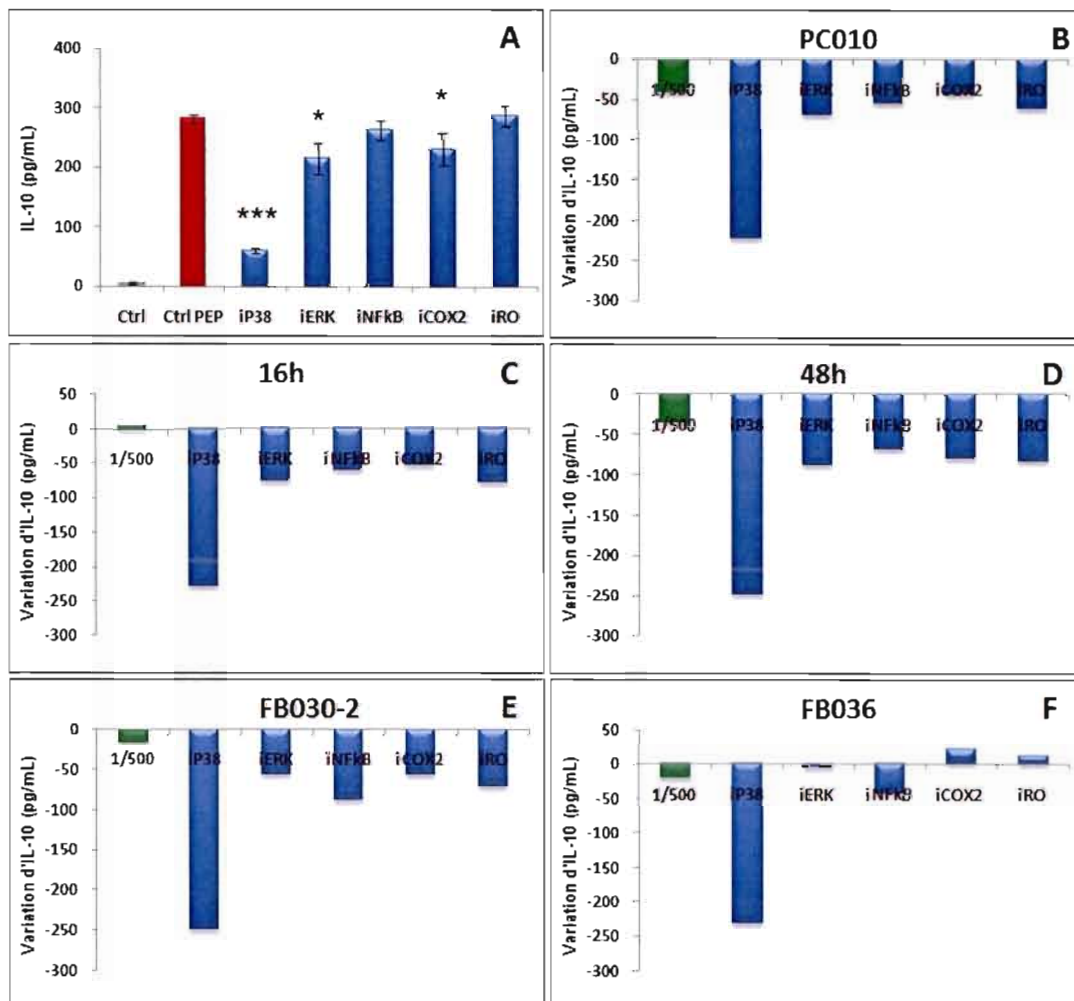


Figure 3.7: Modifications dans la production d'IL-10 par les macrophages de souris C57BL/6 traités par le peptidoglycane et différents produits BiolActis, en présence ou en absence d'inhibiteurs spécifiques. Les macrophages ($2,5 \times 10^5$) de rate de souris C57BL/6 sont isolés par adhérence. Les macrophages sont stimulés avec du peptidoglycane (10 $\mu\text{g/mL}$) durant 2 h, les différents inhibiteurs y sont ajoutés pour une durée de 1 h avant l'ajout des différents produits de BiolActis (dilution 1/500). Les cellules sont incubées à 37°C , 5% CO_2 . Les surnageants sont récoltés après 24 h et l'IL-10 est dosée par un test ELISA. Les différents inhibiteurs sont U0126 (iERK), SN-50 (iNFkB), SB203580 (iP38), COX-2 Inhibitor II (iCOX2) et Naltrexone (iRO). Les résultats sont représentatifs de deux expériences et le test statistique effectué est le test t de Student en comparaison avec le Ctrl PEP (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

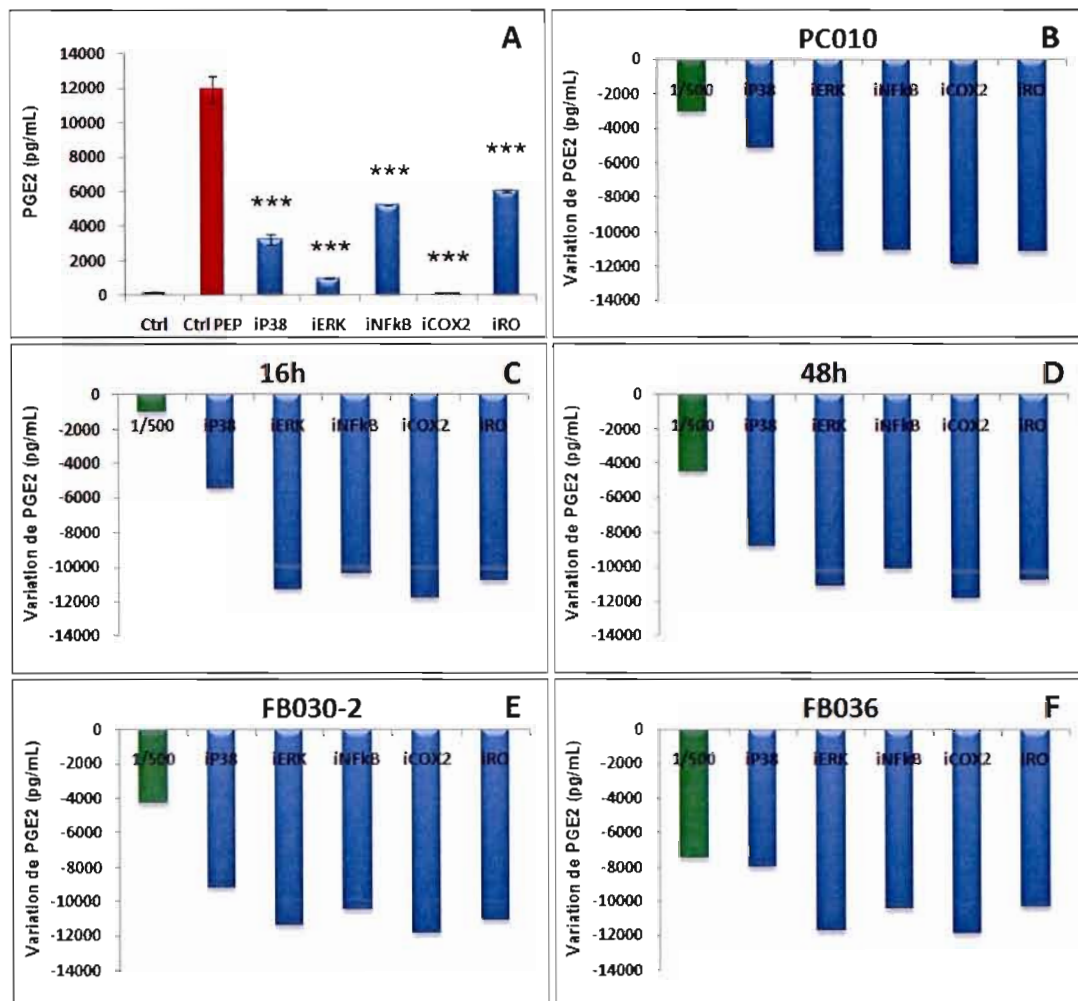


Figure 3.8: Modifications dans la production de PGE2 par les macrophages de souris C57BL/6 traités par le peptidoglycane et différents produits BiolActis, en présence ou en absence d'inhibiteurs spécifiques. Les macrophages ($2,5 \times 10^5$) de rate de souris C57BL/6 sont isolés par adhérence. Les macrophages sont stimulés avec du peptidoglycane (10 ug/mL) durant 2 h, les différents inhibiteurs y sont ajoutés pour une durée de 1 h avant l'ajout des différents produits de BiolActis (dilution 1/500). Les cellules ont été incubées à 37°C, 5% CO₂. Les surnageants sont récoltés après 24 h et la PGE2 est dosée par un test ELISA. Les différents inhibiteurs sont U0126 (iERK), SN-50 (iNFkB), SB203580 (iP38), COX-2 Inhibitor II (iCOX2) et Naltrexone (iRO). Les résultats sont représentatifs de deux expériences et le test statistique effectué est le test t de Student en comparaison avec le Ctrl PEP (***) p < 0.001).

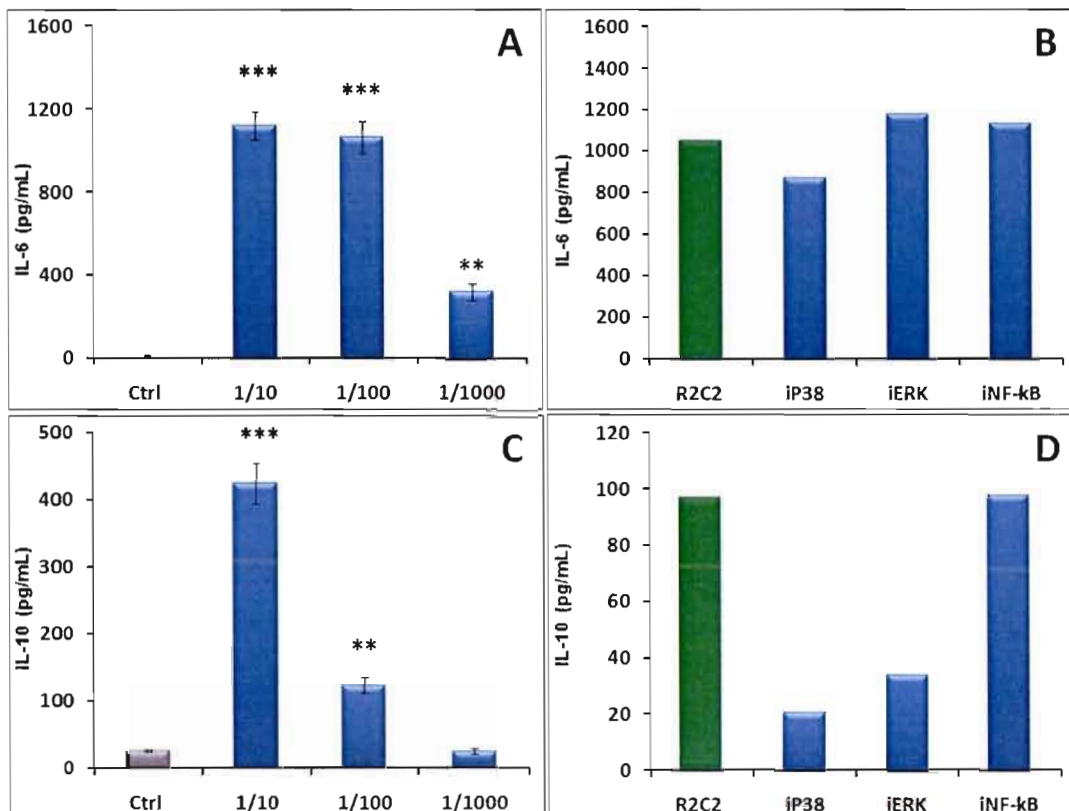


Figure 3.9: Modifications dans la production d'IL-6 et d'IL-10 par les macrophages de souris C57BL/6 traités avec la bactérie *L. kefiranofaciens* R2C2 en présence/absence d'inhibiteurs spécifiques. Les macrophages ($2,5 \times 10^5$) de rate de souris C57BL/6 sont isolés par adhérence. Les macrophages sont mis en présence de diverses dilutions de la bactérie R2C2, les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂, et les surnageants sont recueillis 24 h après (A et C). Les macrophages sont mis en présence d'inhibiteurs spécifiques aux MAPK P38, ERK1/2 et au facteur NF-κB. La suspension de bactérie R2C2 est ajoutée après 1 h (dilution 1/100), les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂, et les surnageants sont récoltés après 24 h (B et D). L'IL-6 et l'IL-10 sont dosées par des tests ELISA. Les différents inhibiteurs sont U0126 (iERK), SN-50 (iNFκB) et SB203580 (iP38). Les résultats sont représentatifs de deux expériences et le test statistique effectué est le test t de Student (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

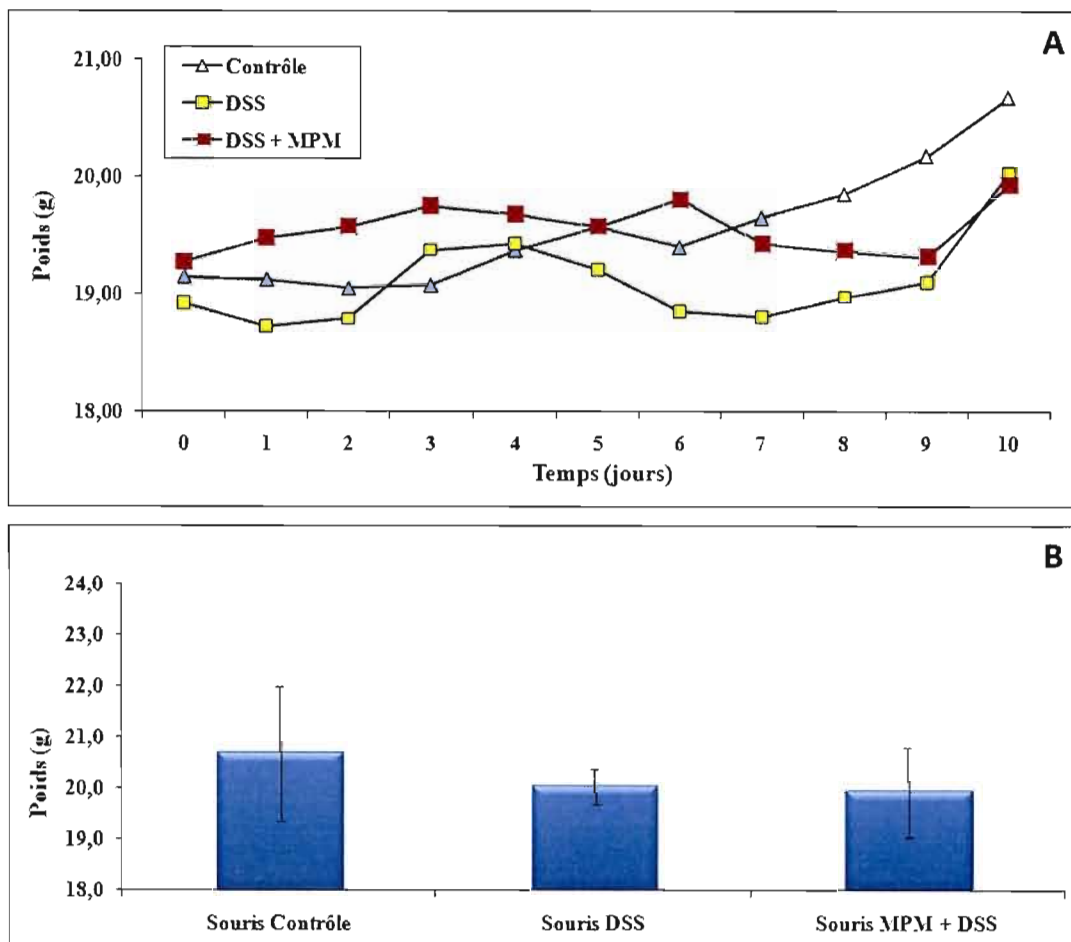


Figure 3.10: Évolution du poids des souris traitées avec des MPMs pendant l'induction de la colite par le DSS. Des groupes de 4 souris C57BL/6 ont reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage pendant les 6 premiers jours. Les souris du groupe DSS + MPM ont reçu en plus 100 μ L de MPM par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours. Évolution du poids moyen des souris lors de l'expérience (A) et poids moyen des souris lors de l'euthanasie (B). Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student.

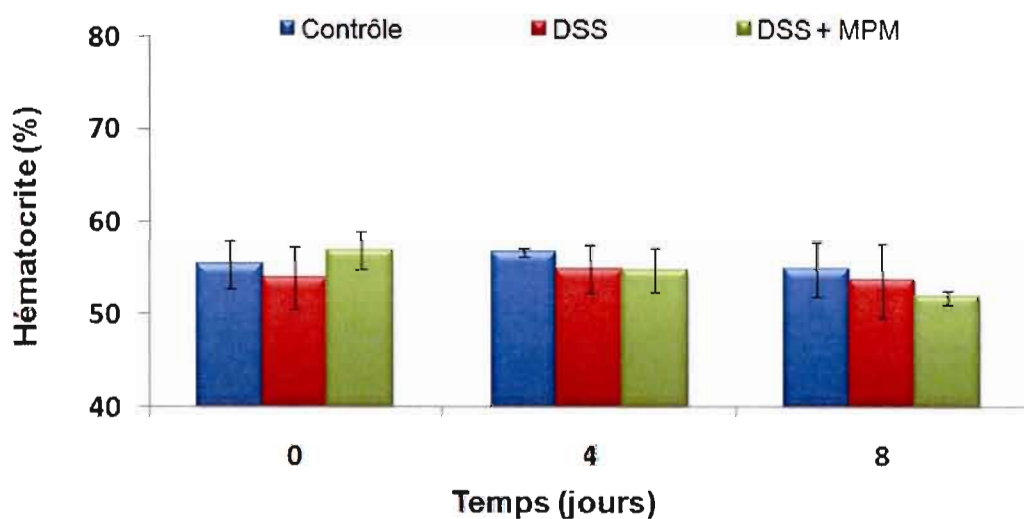


Figure 3.11: Évolution de l'hématocrite chez des souris traitées avec du MPM pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 4 souris C57BL/6 ont reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage pendant les 6 premiers jours. Les souris du groupe DSS + MPM ont reçu en plus 100 μ L de MPM par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours. Le taux d'hématocrite est mesuré aux jours 0, 4 et 8. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student.

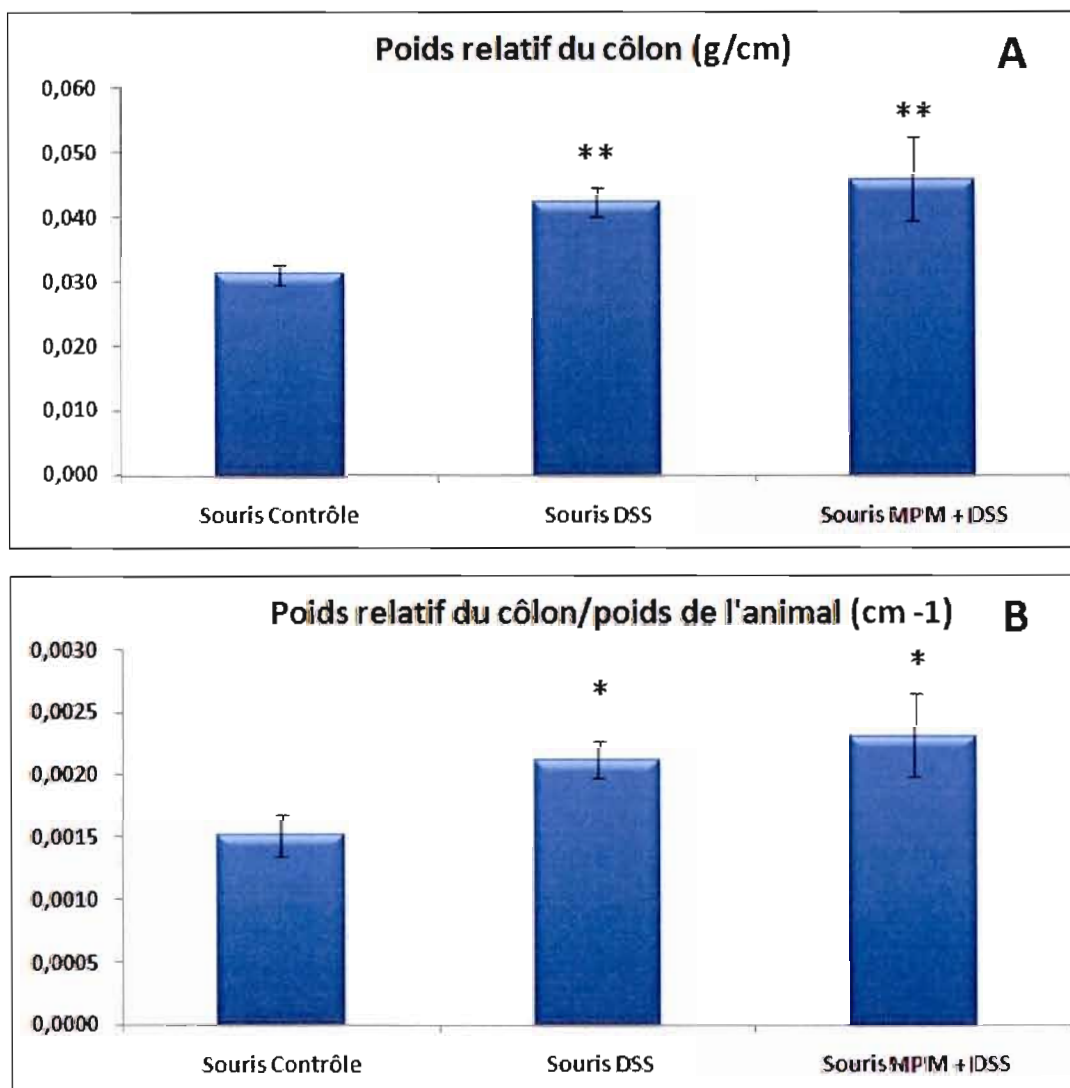


Figure 3.12: Évolution du poids relatif du côlon par centimètre (A) et poids relatif du côlon par gramme de poids de l'animal (B) chez des souris traitées avec du MPM pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 4 souris C57BL/6 ont reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage pendant les 6 premiers jours. Les souris du groupe DSS + MPM ont reçu en plus 100 μ L de MPM par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours. Les côlons sont mesurés et pesés suite à l'euthanasie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

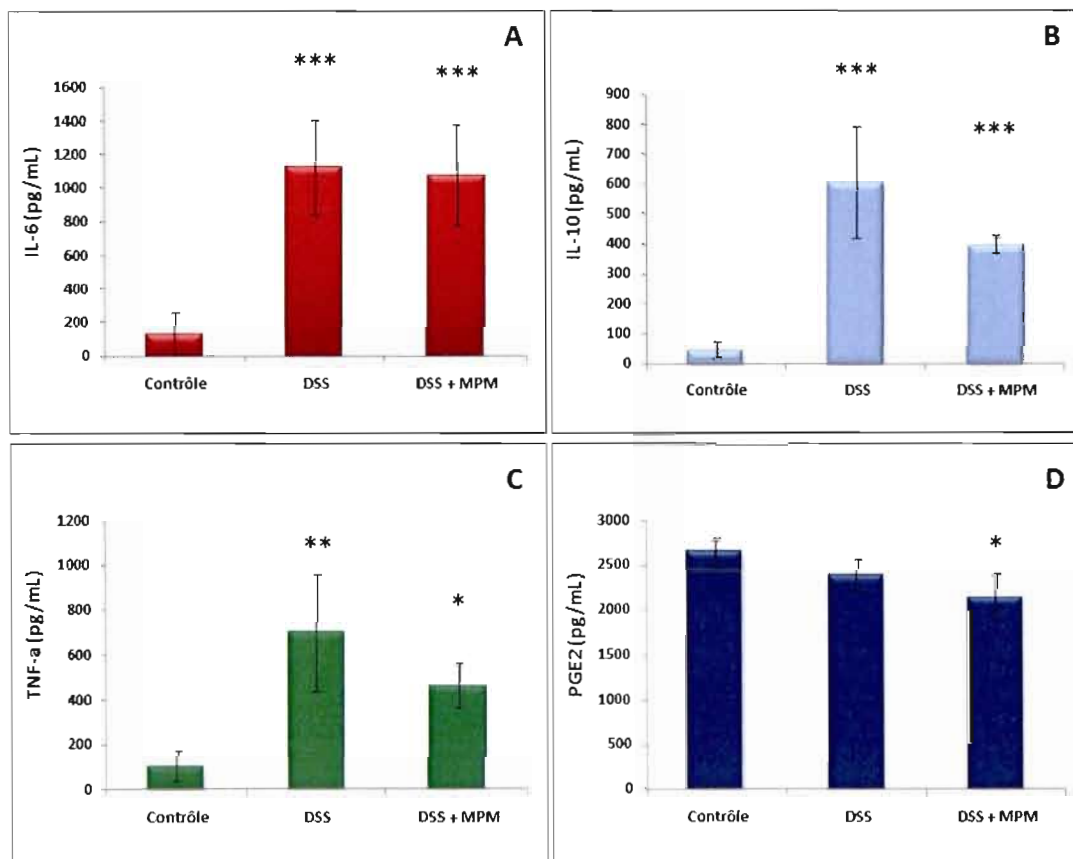


Figure 3.13: Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et de PGE2 chez des souris traitées avec du MPM pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 4 souris C57BL/6 ont reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage pendant les 6 premiers jours. Les souris du groupe DSS+MPM ont reçu en plus 100 μ L de MPM par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours. Les souris sont euthanasiées au jour 10, le petit intestin et le côlon été prélevés. Le côlon est broyé avec 1mL de PBS froid. Le surnageant est récupéré pour dosage des cytokines par ELISA. Les résultats sont représentatifs de deux expériences et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

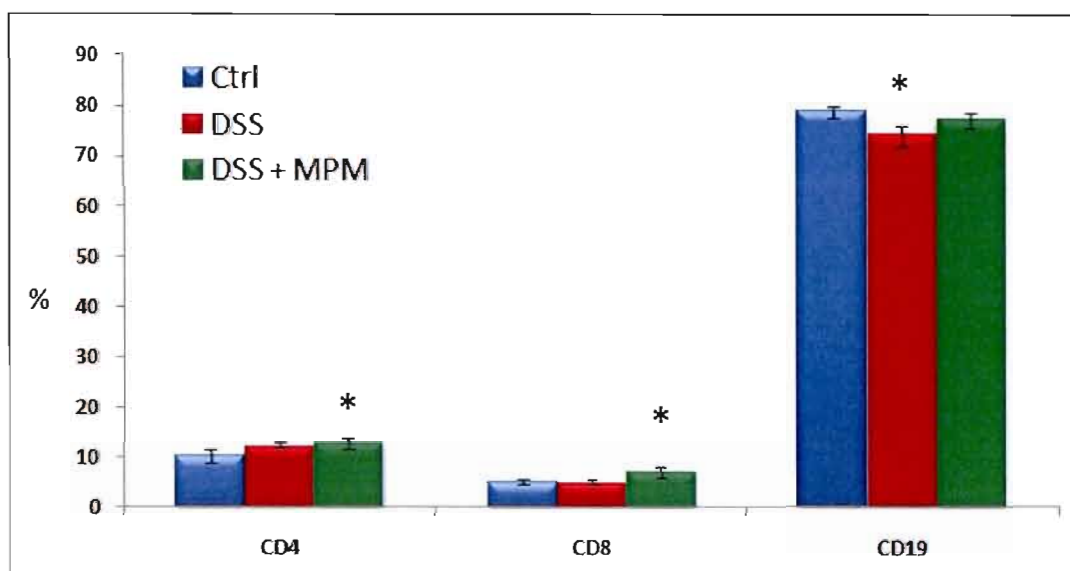


Figure 3.14: Pourcentages de cellules CD4+, CD8+ et CD19+ dans les plaques de Peyer chez des souris traitées avec du MPM pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 4 souris C57BL/6 ont reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage pendant les 6 premiers jours. Les souris du groupe DSS+MPM ont reçu en plus 100 μ L de MPM par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours. Les souris sont euthanasiées au jour 10, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les lymphocytes sont extraits des plaques de Peyer du petit intestin, marqués avec des anticorps anti-CD4, CD8 et CD19 et analysés en cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$).

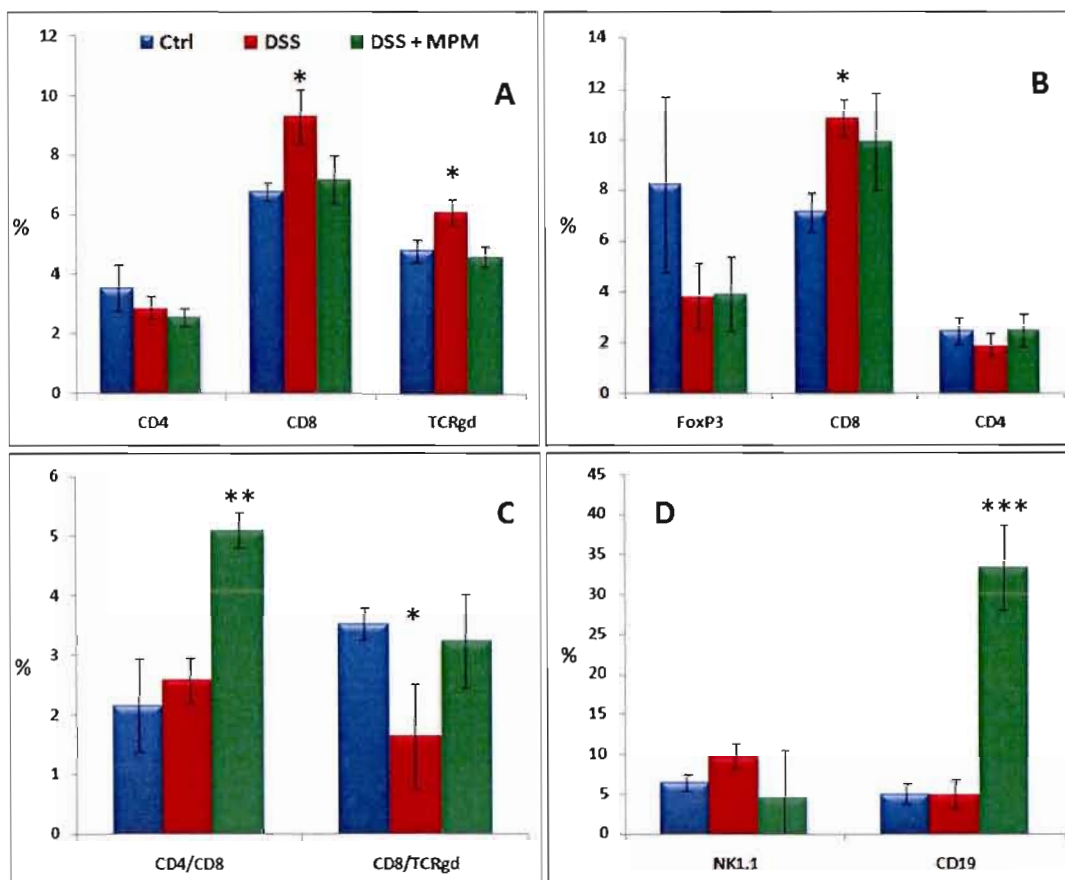


Figure 3.15: Pourcentages de cellules intraépithéliales CD4+, CD8+, TCRgd+ (A), FoxP3+, CD4+, CD8+ (B), CD4/CD8+ et CD8/TCRgd+ (C), NK1.1+ et CD19+ (D) chez des souris traitées avec du MPM pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 4 souris C57BL/6 ont reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage pendant les 6 premiers jours. Les souris du groupe DSS+MPM ont reçu en plus 100 μ L de MPM par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours. Les souris sont euthanasiées au jour 10, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les lymphocytes sont extraits de l'épithélium intestinal, marqués avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-TCR $\gamma\delta$, anti-FoxP3, anti-CD19 et anti-NK1.1 et analysés en cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

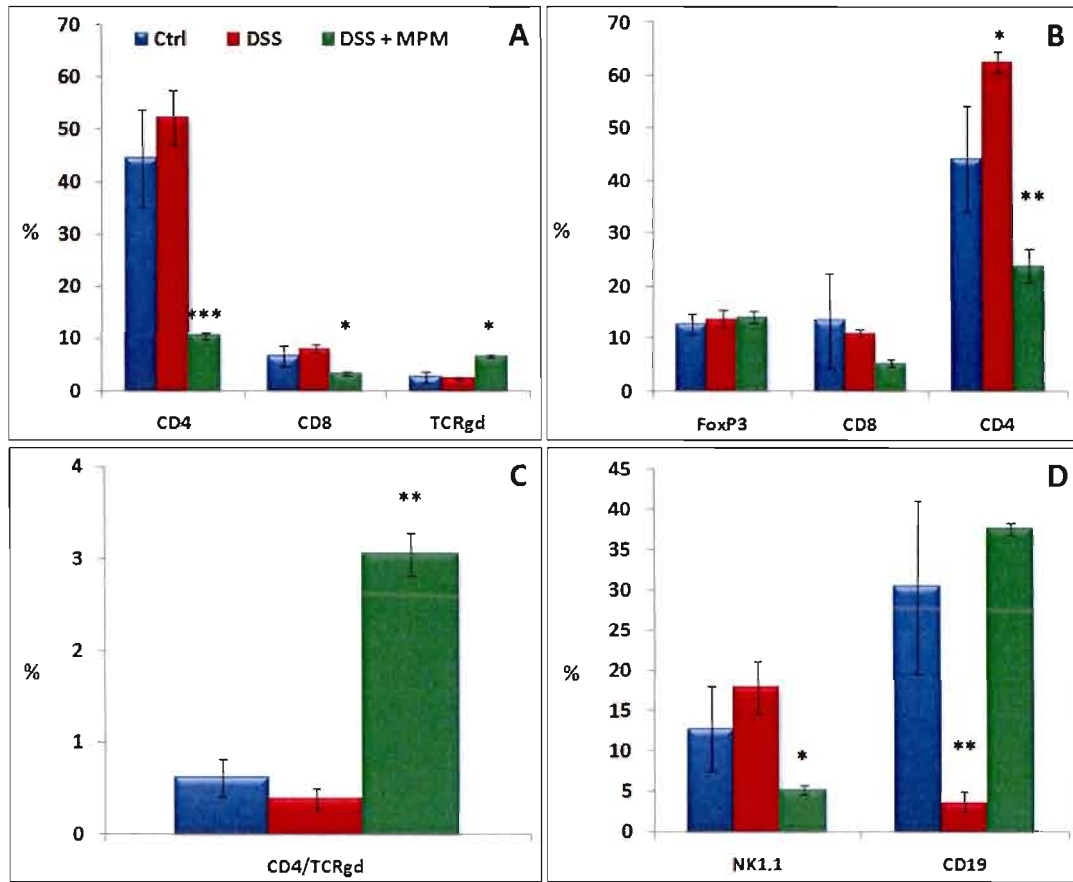


Figure 3.16: Pourcentages de cellules CD4+, CD8+, TCR $\gamma\delta$ + (A), FoxP3+, CD4+, CD8+ (B), CD4+CD8+ et CD8+TCRgd+ (C), NK1.1+ et CD19+ (D) de la lamina propria chez des souris traitées avec du MPM pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 4 souris C57BL/6 ont reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage pendant les 6 premiers jours. Les souris du groupe DSS+MPM ont reçu en plus 100 μ L de MPM par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours. Les souris sont euthanasiées au jour 10, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les lymphocytes sont extraits de l'épithélium intestinal, marqués avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-TCR $\gamma\delta$, anti-FoxP3, anti-CD19 et anti-NK1.1 et analysés en cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

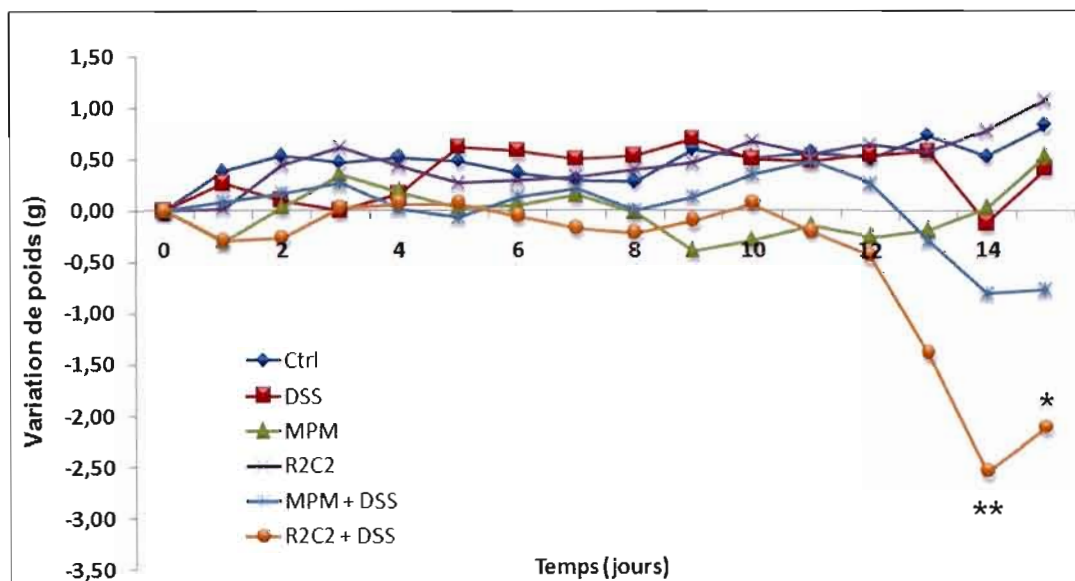


Figure 3.17: Évolution du poids chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Des groupes ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris contrôles ont reçu par gavage le même volume en eau. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

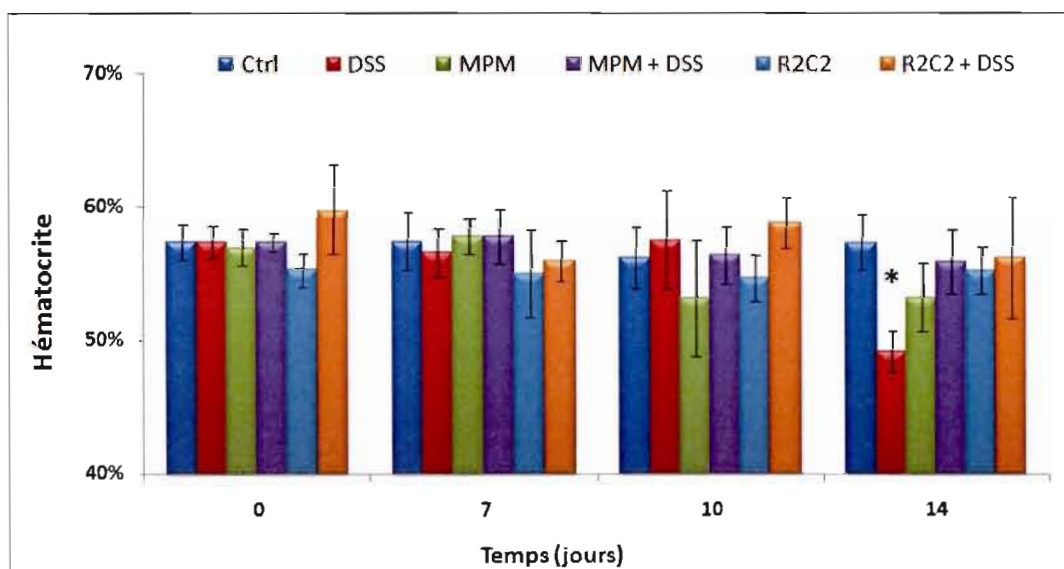


Figure 3.18: Évolution de l'hématocrite chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Des groupes ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris contrôles ont reçu par gavage le même volume en eau. Le taux d'hématocrite est mesuré aux jours 0, 7, 10 et 14. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$).

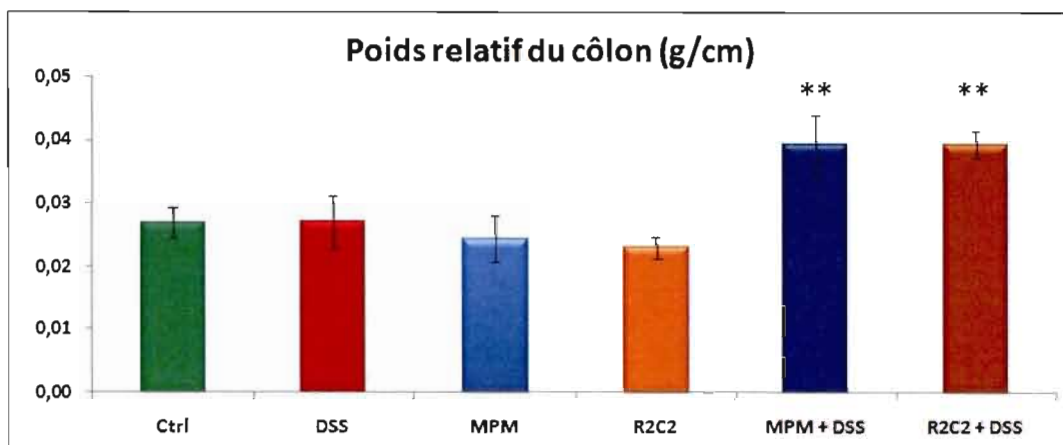


Figure 3.19: Évolution du poids relatif du côlon par centimètre chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Les groupes avec DSS ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris sont euthanasiées au jour 14, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les côlons sont mesurés et pesés. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (** $p < 0.01$).

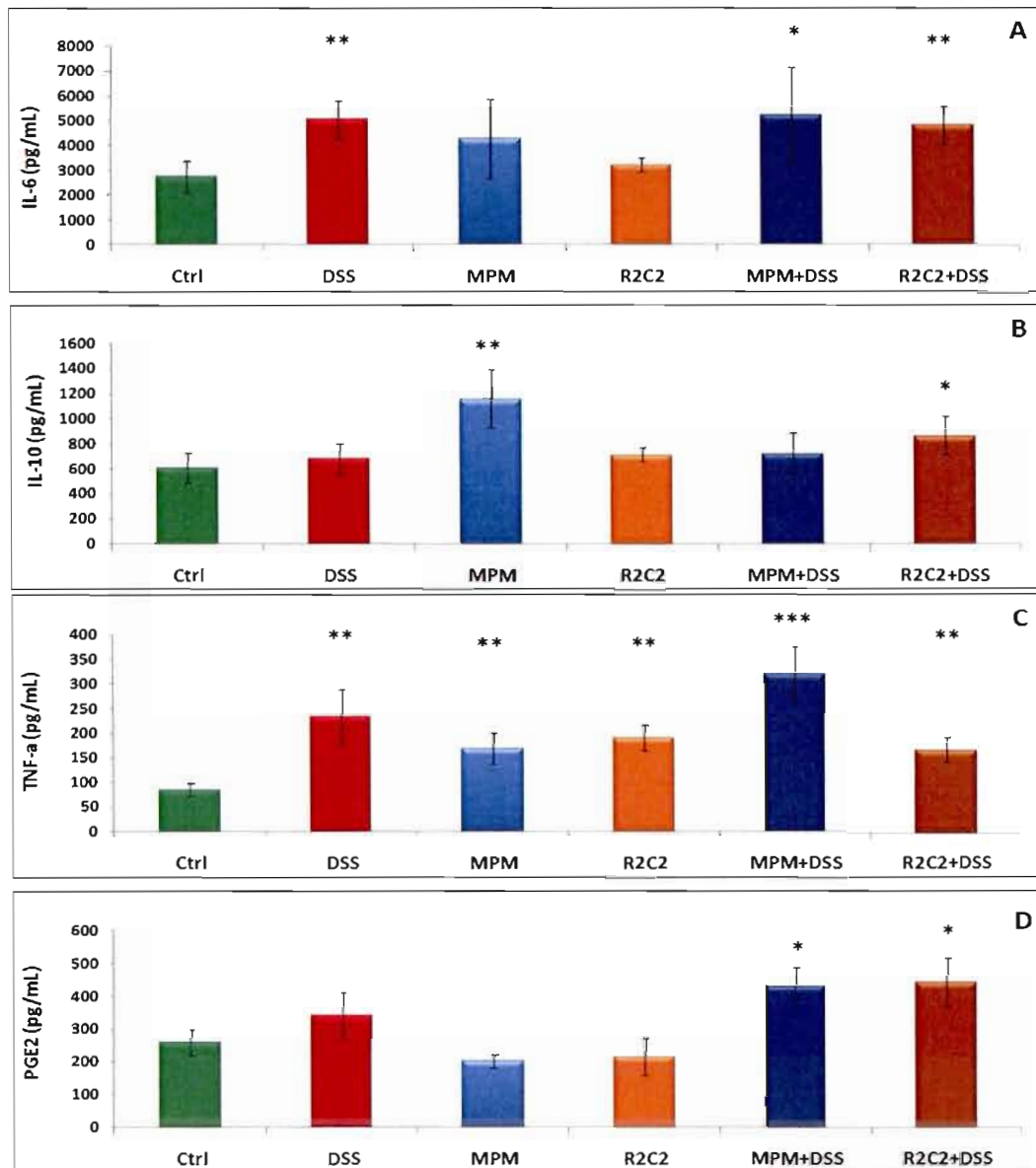


Figure 3.20: Production de TNF- α , d'IL-6, d'IL-10 et de PGE2 chez des souris traitées avec du MPM ou R2C2 avant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Les groupes avec DSS ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris sont euthanasiées au jour 14, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Le côlon est broyé avec 1mL de PBS froid. Le surnageant est récupéré pour dosage des cytokines par des tests ELISA. Les résultats sont représentatifs de deux expériences et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

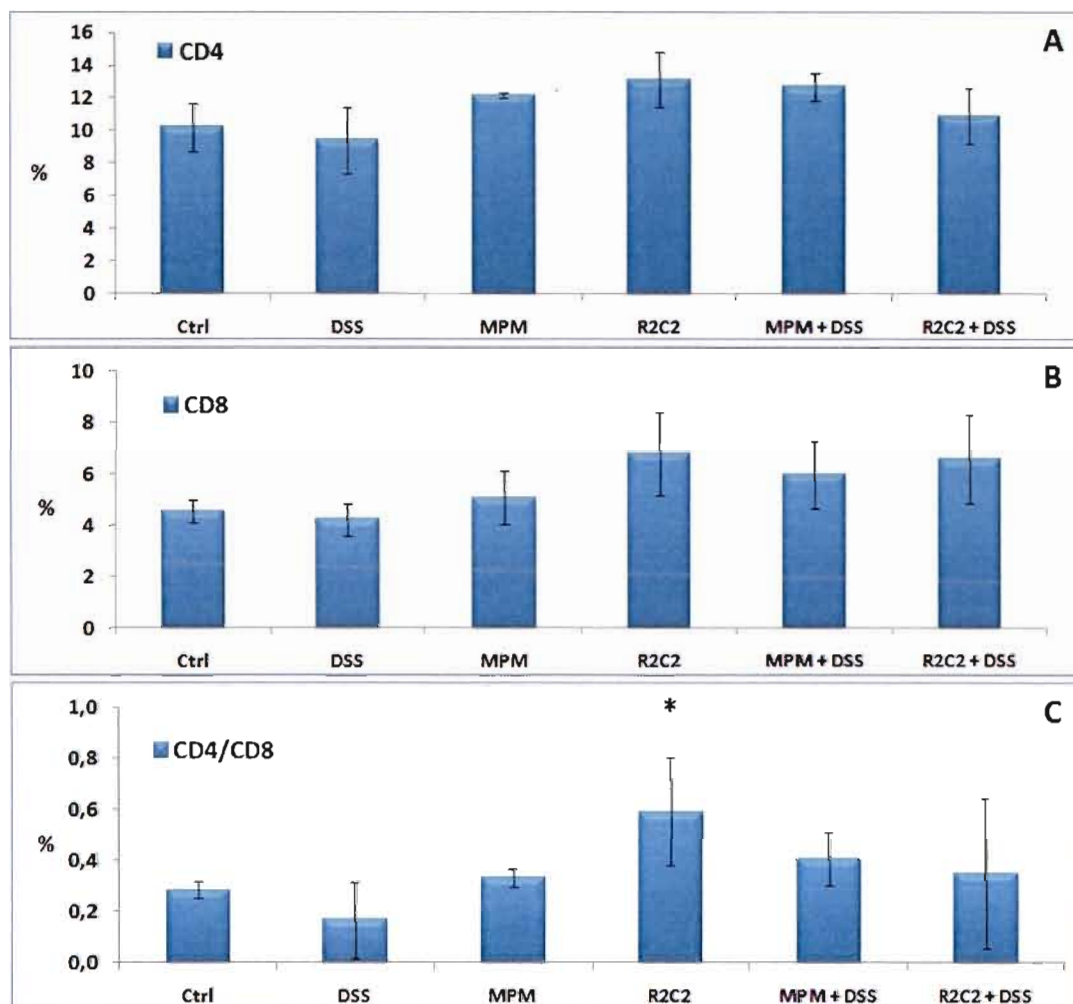


Figure 3.21: Pourcentages de cellules CD4+ (A), CD8+ (B) et CD4+CD8+ (C) dans les plaques de Peyer chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Les groupes avec DSS ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris sont euthanasiées au jour 14, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les lymphocytes sont extraits des plaques de Peyer du petit intestin, marqués avec des anticorps anti-CD4 et CD8 et ensuite analysés en cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

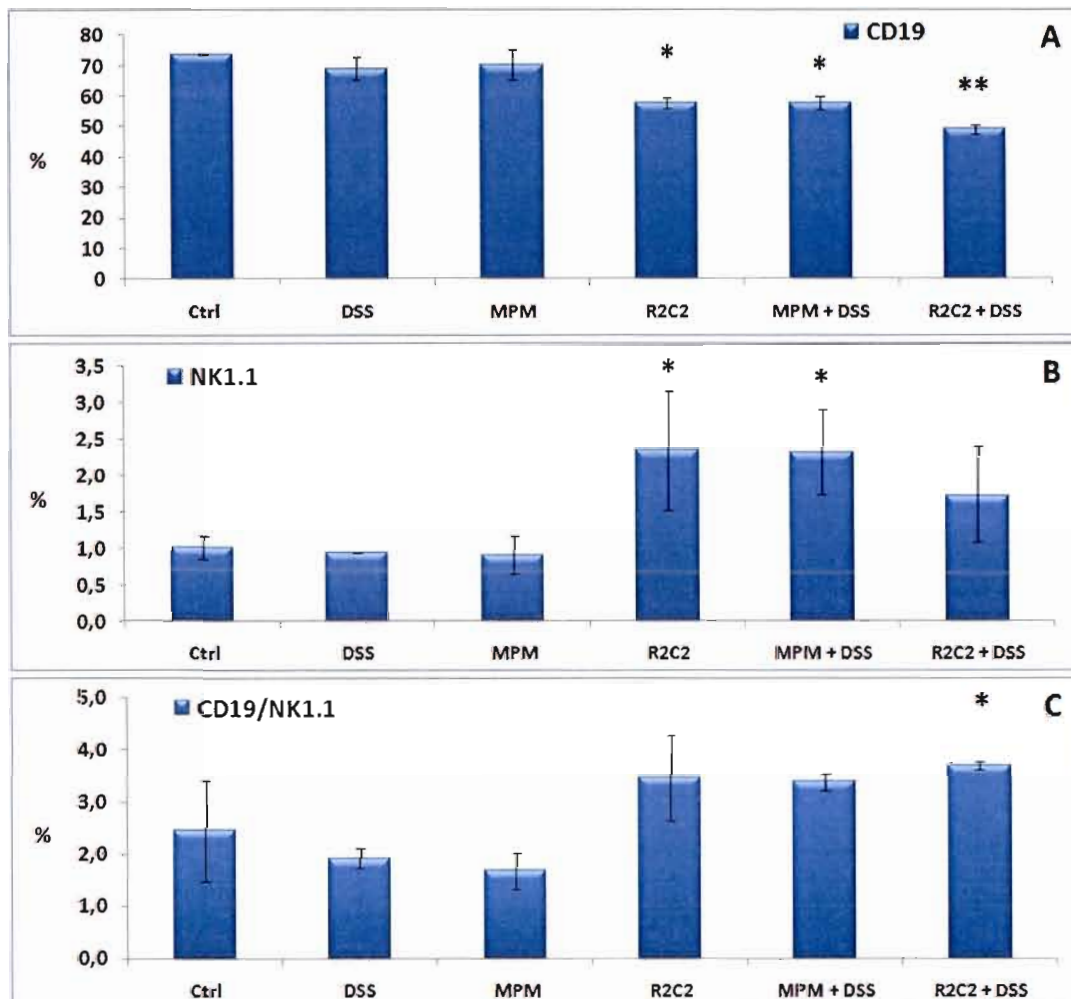


Figure 3.22: Pourcentages de cellules CD19+ (A), NK1.1+ (B) et CD19+NK1.1+ (C) dans les plaques de Peyer chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Les groupes avec DSS ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris sont euthanasiées au jour 14, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les lymphocytes sont extraits des plaques de Peyer du petit intestin, marqués avec des anticorps anti-CD19 et NK1.1 et ensuite analysés en cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

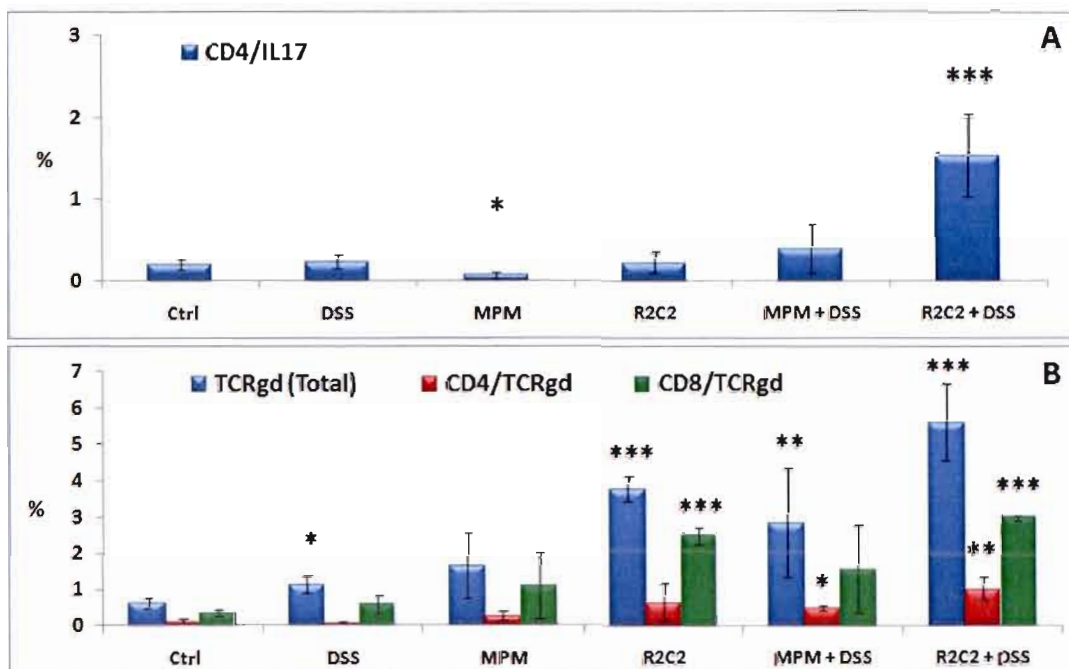


Figure 3.23: Pourcentages de cellules CD4+IL17+ (A) et TCR $\gamma\delta$ +, CD4+TCR $\gamma\delta$ +, CD8+TCR $\gamma\delta$ + (B), dans les plaques de Peyer chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Les groupes avec DSS ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris sont euthanasiées au jour 14, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les lymphocytes sont extraits des plaques de Peyer du petit intestin, marqués avec des anticorps anti-CD4 et IL17, anti-CD4, CD8 et TCR $\gamma\delta$, et ensuite analysés en cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

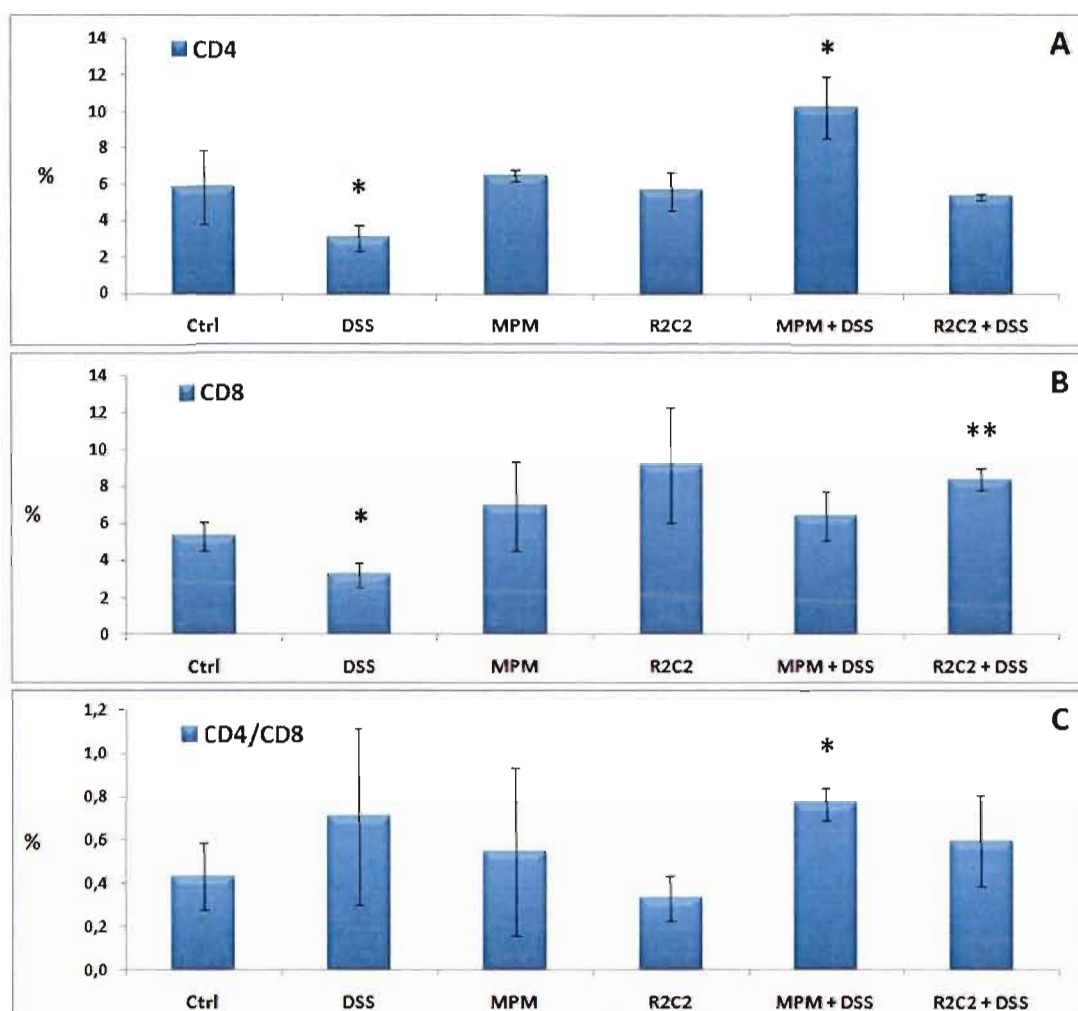


Figure 3.24: Pourcentages de cellules intraépithéliales CD4⁺ (A), CD8⁺ (B) et CD4⁺CD8⁺ (C) de l'intestin grêle chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Les groupes avec DSS ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris sont euthanasiées au jour 14, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les lymphocytes intraépithéliaux sont extraits du petit intestin, marqués avec des anticorps anti-CD4 et CD8 et ensuite analysés en cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

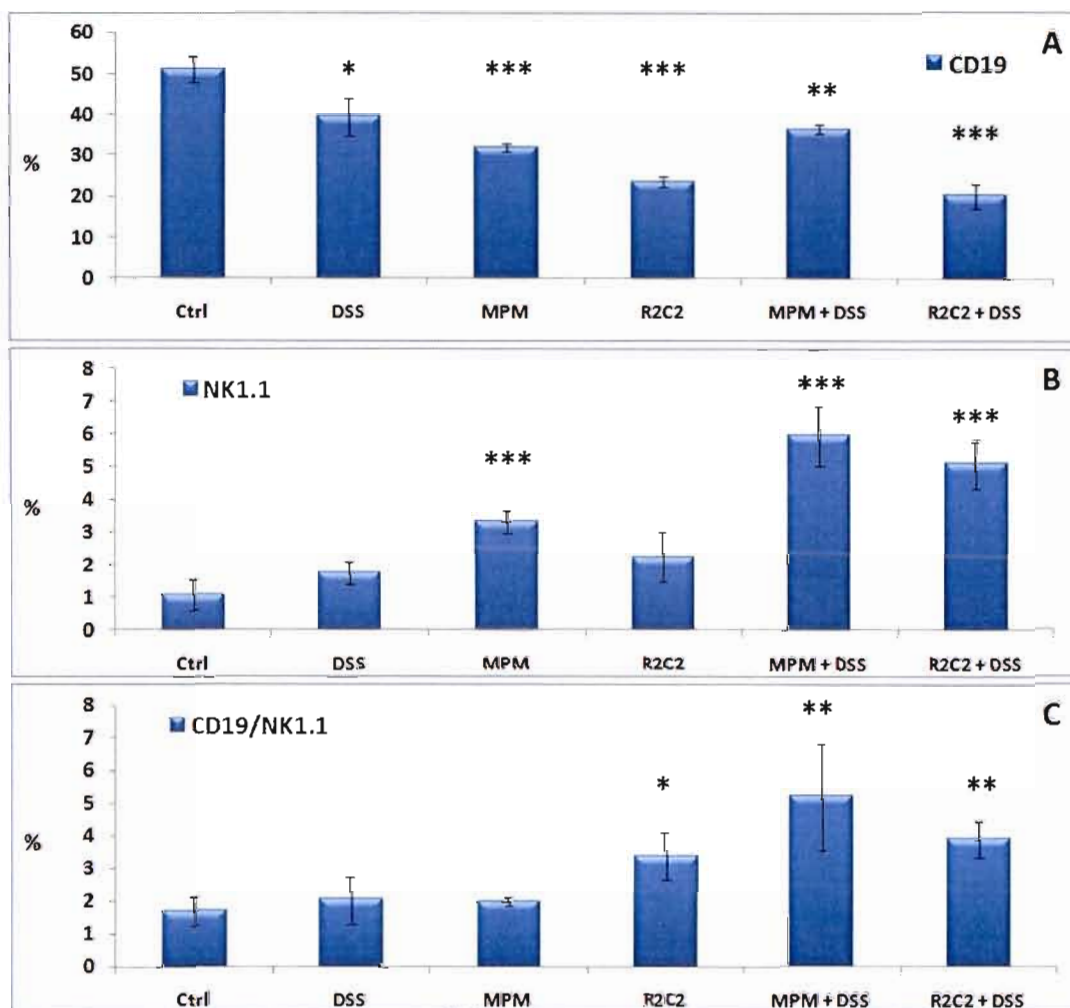


Figure 3.25: Pourcentages de cellules intraépithéliales CD19⁺ (A), NK1.1⁺ (B) et CD19⁺NK1.1⁺ (C) de l'intestin grêle chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Les groupes avec DSS ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris sont euthanasiées au jour 14, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les lymphocytes intraépithéliaux sont extraits du petit intestin, marqués avec des anticorps anti-CD19 et NK1.1 et ensuite analysés en cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

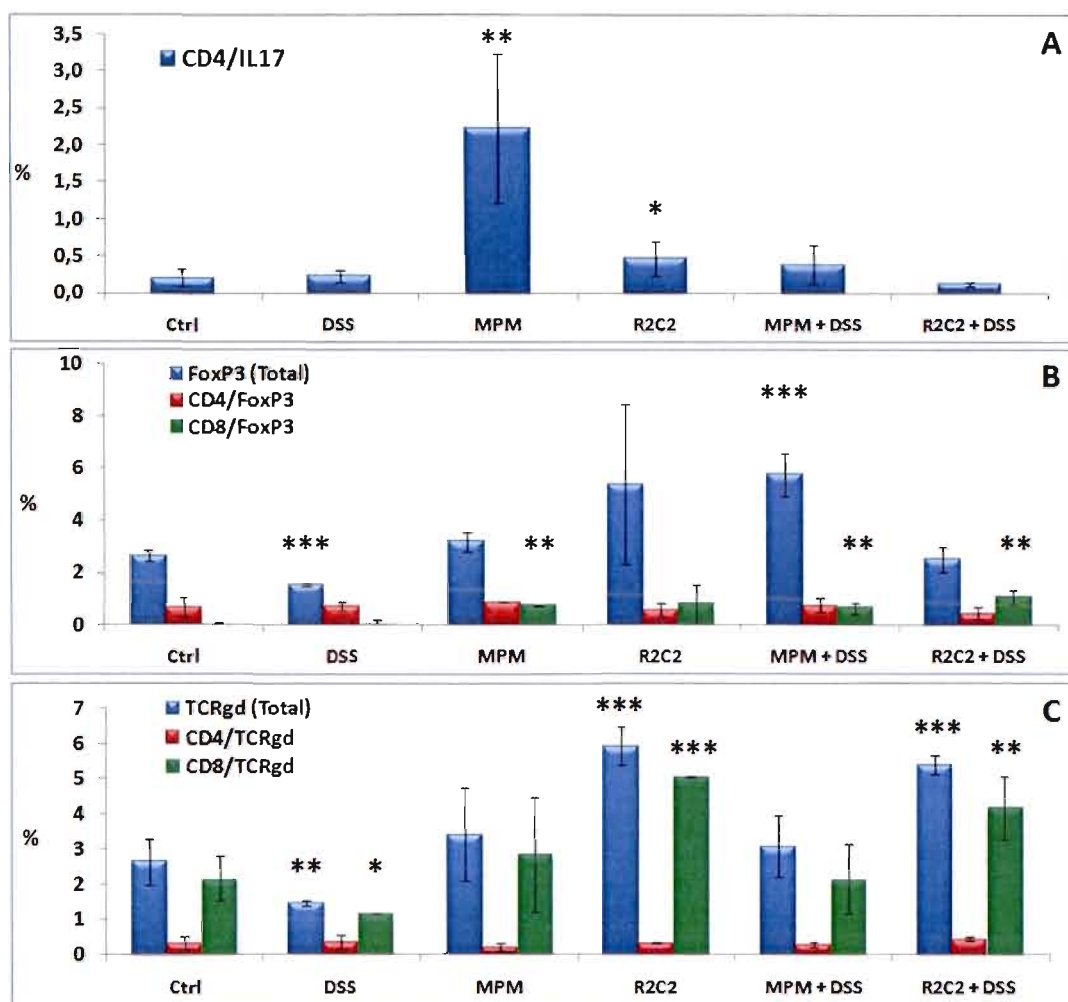


Figure 3.26: Pourcentages de cellules intraépithéliales CD4+IL17+ (A), FoxP3+, CD4+FoxP3+, CD8+FoxP3+ (B) et TCRγδ+, CD4+TCRγδ+, CD8+TCRγδ+ (C) de l'intestin grêle chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 µL de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Les groupes avec DSS ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris sont euthanasiées au jour 14, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les lymphocytes intraépithéliaux sont extraits du petit intestin, marqués avec des anticorps anti-CD4 et IL17, anti-FoxP3, CD4 et CD8, anti-CD4, CD8 et TCRγδ, et ensuite analysés en cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

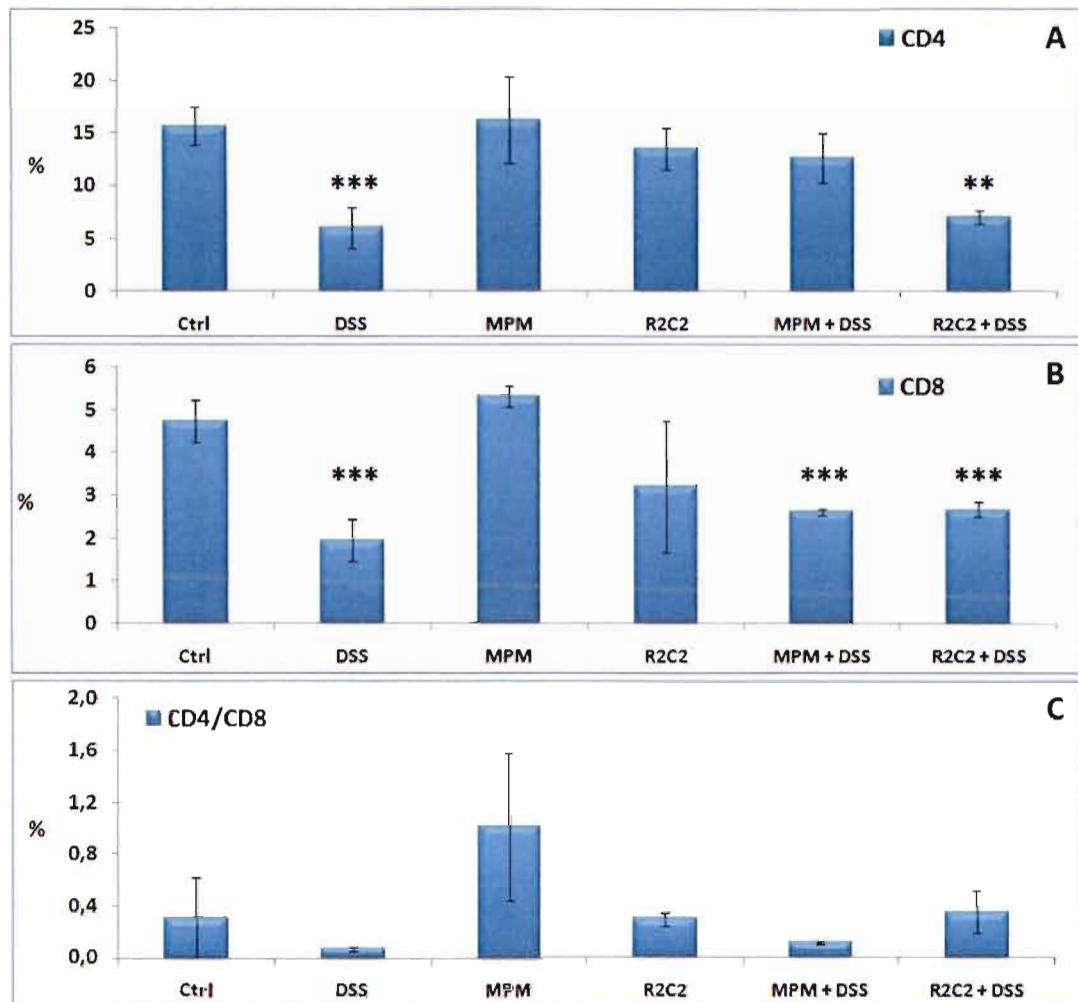


Figure 3.27: Pourcentages de cellules CD4+ (A), CD8+ (B) et CD4+CD8+ (C) de la lamina propria de l'intestin grêle chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Les groupes avec DSS ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris sont euthanasiées au jour 14, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les lymphocytes de la lamina propria sont extraits du petit intestin, marqués avec des anticorps anti-CD4 et CD8 et ensuite analysés en cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

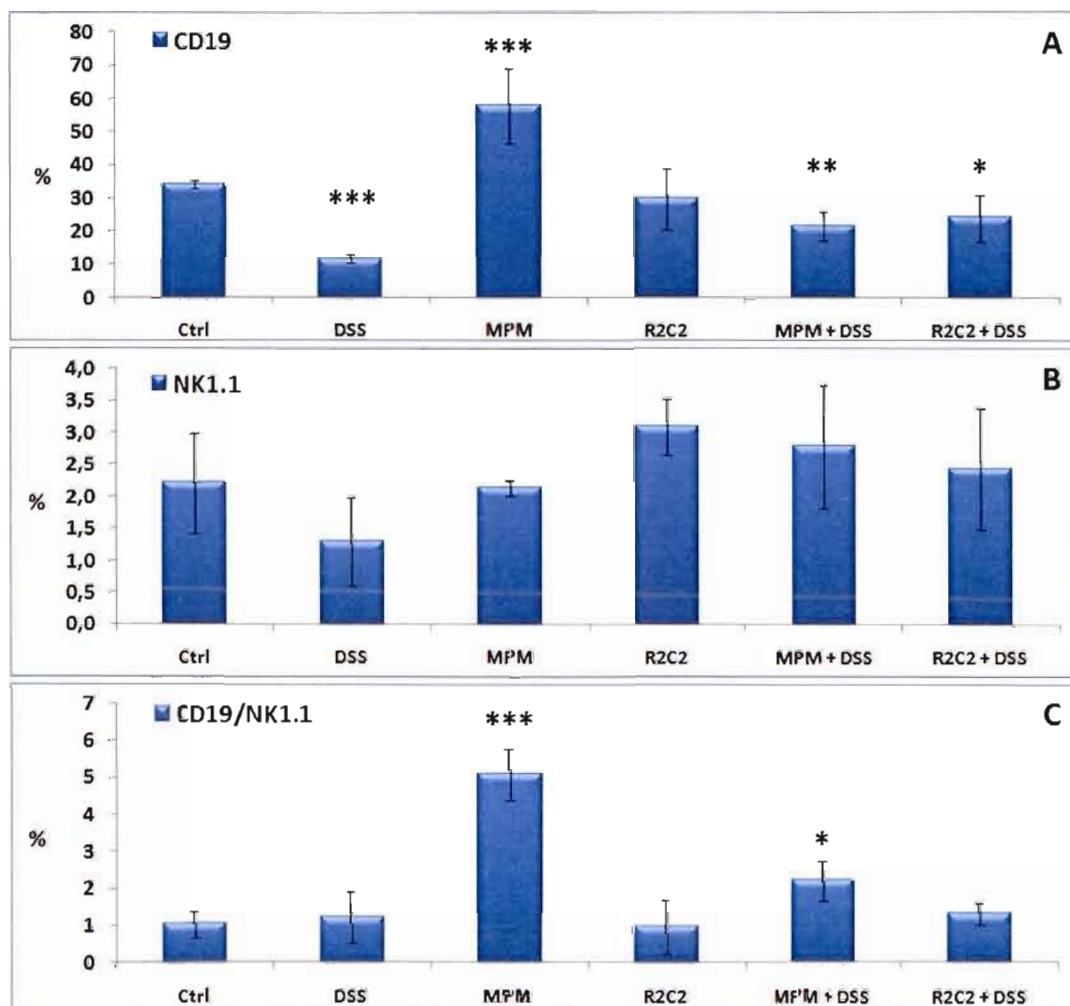


Figure 3.28: Pourcentages de cellules CD19+ (A), NK1.1+ (B) et CD19+NK1.1+ (C) de la lamina propria de l'intestin grêle chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Les groupes avec DSS ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris sont euthanasiées au jour 14, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les lymphocytes de la lamina propria sont extraits du petit intestin, marqués avec des anticorps anti-CD19 et NK1.1 et ensuite analysés en cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

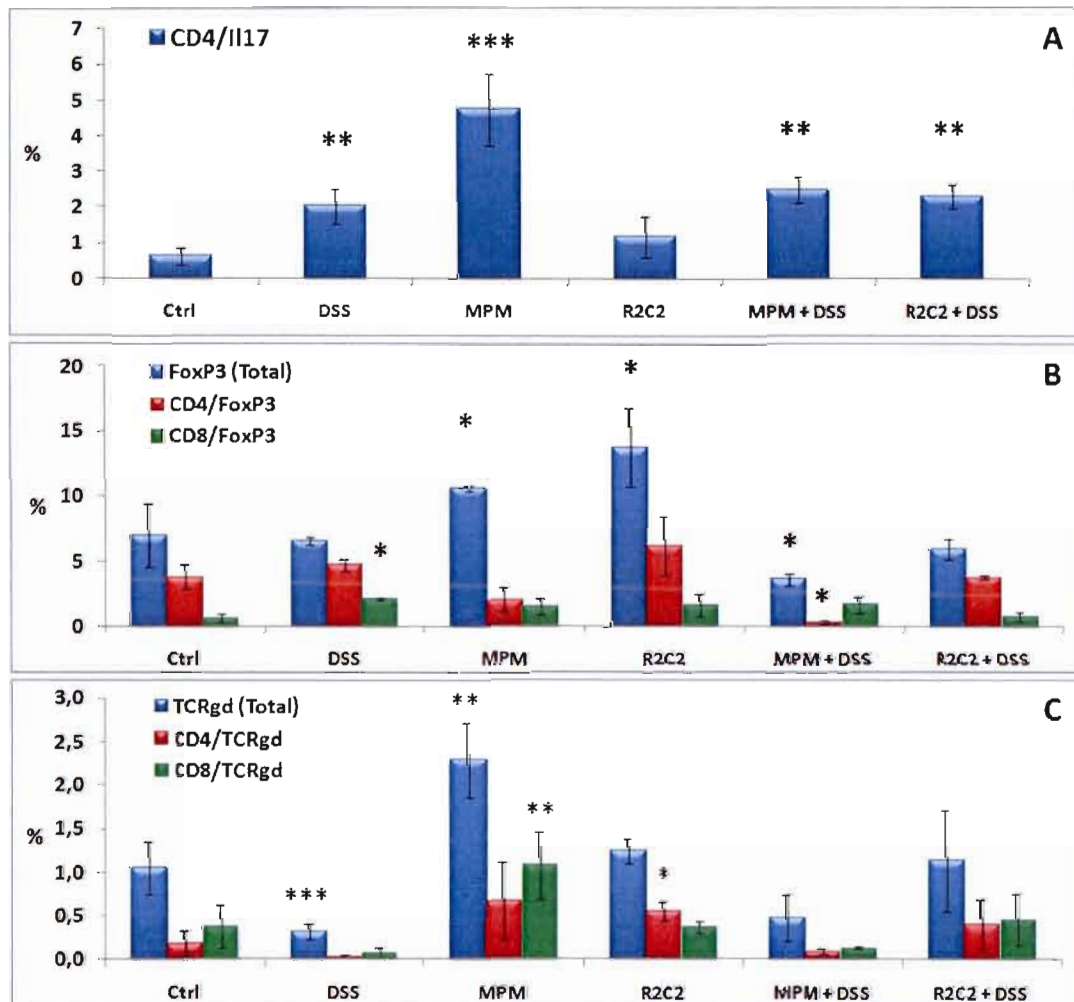


Figure 3.29: Pourcentages de cellules CD4+IL17+ (A), FoxP3+, CD4+FoxP3+, CD8+FoxP3+ (B) et TCRγδ+, CD4+TCRγδ+, CD8+TCRγδ+ (C) de la lamina propria de l'intestin grêle chez des souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 µL de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Les groupes avec DSS ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris sont euthanasiées au jour 14, le petit intestin et le côlon sont prélevés. Les lymphocytes de la lamina propria sont extraits du petit intestin, marqués avec des anticorps anti-CD4 et IL17, anti-FoxP3, CD4 et CD8, anti-CD4, CD8 et TCRγδ, et ensuite analysés en cytofluorométrie. Les résultats sont représentatifs de deux mesures et le test statistique effectué est le test t de Student (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

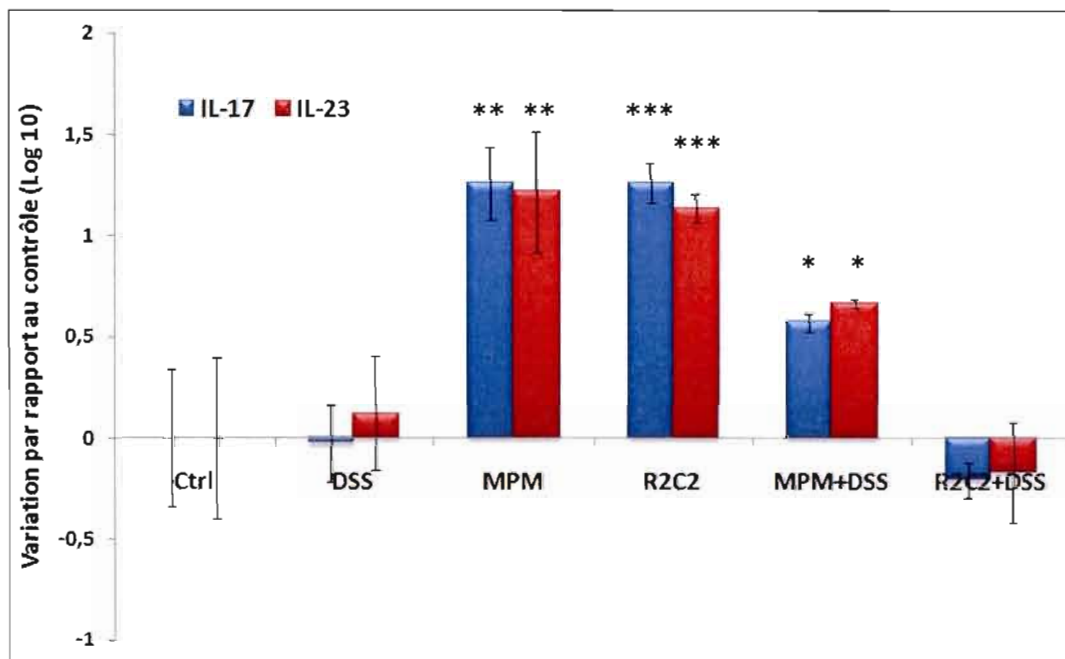


Figure 3.30 : Niveaux relatifs d'IL-17 et d'IL-23 exprimés dans les côlons de souris traitées préventivement avec du MPM ou R2C2 avant et pendant l'induction d'une colite par le DSS. Des groupes de 6 souris C57BL/6 ont reçu 100 μ L de MPM ou de R2C2 par 20 g (poids) par gavage oral à tous les jours durant 14 jours. Les groupes avec DSS ont aussi reçu 2,5% de DSS dans l'eau de breuvage à partir du jour 7 jusqu'au 14^e jour. Les souris sont euthanasiées au jour 14, le petit intestin et le côlon sont prélevés. L'ARN est extrait d'un morceau de côlon d'environ 1 cm. Ensuite 700 ng de cet ARN est rétro-transcrit en ADNc. L'ADNc obtenu a ensuite été analysé par qPCR avec amorces spécifiques à l'IL-17 et l'IL-23 par la méthode de fluorescence avec SYBR Green. Les résultats sont représentatifs de deux expériences et le test statistique effectué est le test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les objectifs de ce projet étaient de rechercher les propriétés immunomodulatrices de certains produits obtenus par la fermentation du lactosérum à l'aide de souches sélectionnées de *L. kefiranofaciens* développées par Les Technologies BioActis Inc. Une matrice protéique malléable (MPM) ainsi que des substances solubles et des bactéries ont été générées par fermentation et leurs effets sur des macrophages et cellules épithéliales ont été évalués par l'analyse de la production de cytokines pro et anti-inflammatoires ainsi que des voies de signalisation intracellulaire impliquées. Il était aussi proposé de vérifier l'efficacité anti-inflammatoire des MPMs et de la souche bactérienne lors de colite expérimentale aigue chez des animaux et d'identifier les cytokines et cellules suppressives impliquées. Ainsi, des études *in vivo* ont été réalisées chez des groupes de souris traitées simultanément ou de façon préventive avec des produits choisis afin d'en vérifier les effets anti-inflammatoires lors de l'induction de la colite expérimentale par le DSS. De nombreux paramètres biologiques et immunologiques ont été évalués, tels que le poids, le taux d'hématocrite, la densité du côlon, la production de cytokines par ELISA ou RT-PCR en temps réel ainsi que plusieurs immunomarquages doubles ou triples des diverses populations lymphocytaires des tissus intestinaux.

Au cours de ce travail, nous avons mis en lumière les propriétés immunomodulatrices des produits de fermentation du lactosérum par des souches sélectionnées de *L. kefiranofaciens* développés par la compagnie BioActis. Nous avons observé que les différents produits de fermentation du lactosérum exprimaient peu ou pas de cytotoxicité autant pour les cellules épithéliales intestinales que pour les cellules mononucléaires spléniques. Par contre, les cellules Caco-2 utilisées ont montré un niveau de fragilité important tout au long de nos expériences, ce qui n'a pas permis d'évaluer de façon optimale la toxicité des différents produits de BioActis. Cette fragilité pourrait être expliquée par la croissance trop rapide des cellules en culture et la concentration cellulaire élevée utilisée pour les tests de toxicité. Tous les produits testés favorisaient une diminution de la production de

l'IL-8 par les cellules épithéliales intestinales et de l'IL-6 par les cellules mononucléaires spléniques. Ces produits inhibent la production d'IL-10 et de la PGE2 chez les macrophages spléniques. Aussi, lors de la colite expérimentale induite par une dose modérée de DSS (2,5%), l'administration simultanée de MPM a corrigé substantiellement la perte de poids des animaux, réduit la production intestinale de TNF- α et rétablit la perte de lymphocytes B dans les tissus épithéliaux intestinaux, sans qu'il puisse être actuellement possible de déterminer si cette correction résulte d'une stimulation des lymphocytes B ou empêche la perte de ces cellules du tissu. Finalement, nous avons remarqué que l'utilisation préventive du MPM et de la bactérie R2C2 a empêché l'anémie induite par le DSS, mais n'a pas semblé réduire la perte de poids et l'inflammation du côlon suite à l'activation d'une classe particulière de lymphocytes inflammatoires, les cellules Th17, dans le cas du MPM, et possiblement des cellules Th1 pour la bactérie R2C2 et ce, malgré l'augmentation de la production d'IL-10 et de la stimulation des lymphocytes T suppresseurs.

Le lactosérum est un dérivé de l'industrie fromagère qui contient des protéines telles que la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine, la lactoferrine, l'albumine et des globulines ainsi que des peptides dérivés ou non de ces protéines (Bounous *et al.*, 1991). La fermentation de ce lactosérum par des souches sélectionnées de *L. kefiranofaciens* module les concentrations de ces protéines et des peptides tout en enrichissant le produit de composantes bactériennes incluant les exopolysaccharides (Beaulieu *et al.*, 2006). Plusieurs de ces composants ont des effets immunostimulants ou anti-inflammatoires, ce qui permet de développer des processus de fermentation à l'aide de souches bactériennes sélectionnées axées vers l'enrichissement ou la dégradation de ces protéines de façon à obtenir un produit avec les propriétés immunomodulatrices désirées. Ainsi, la lactoferrine présente en forte concentration dans le lait possède des propriétés antibactériennes mais aussi des propriétés immunomodulatrices reliées à son interaction directe avec les cellules immunitaires (de la Rose G *et al.*, 2008). Des résultats préliminaires effectués au laboratoire suggèrent que lactosérum non-fermenté diminuait l'activité des lymphocytes traités avec un milieu conditionné provenant de macrophages non-activés mais pouvait aussi favoriser une augmentation d'activité des lymphocytes en présence du LPS et du PEP. Ces effets pouvaient être expliqués par la nature des cytokines produites puisque seulement très peu de TNF- α était induit par les

macrophages non-activés alors qu'en présence de macrophages activés par le LPS et le PEP, le lactosérum non-fermenté stimulait fortement la production de TNF- α et d'IL-6. Ces résultats préliminaires nous ont orientés vers l'étude plus spécifique de l'IL-6.

Il a été récemment démontré que la lactoferrine stimule la défense innée en augmentant la production de TNF- α , d'IL-1 β ainsi que des chimiokines impliquées dans le recrutement des macrophages et des neutrophiles ainsi que des molécules de co-stimulation chez les lymphocytes (de la Rose G *et al.*, 2008). Nous avons montré que les différentes préparations de BiolActis provenant de la fermentation du lactosérum montraient des propriétés communes mais aussi différentes selon les préparations. La fermentation du lactosérum par la souche R2C2 de *L. kefiranofaciens* induit en même temps une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-6, mais aussi une cytokine suppressive, l'IL-10, suggérant que le processus de fermentation génère des peptides immunostimulateurs ou diminue des molécules inhibitrices ou les deux en même temps. La production de ces cytokines antagonistes pourrait expliquer les variations observées dans les niveaux de ces cytokines induits par les différents produits de fermentation. Par exemple, le produit PC010 induit très peu la production de cytokines autant pro- qu'anti-inflammatoires alors que le produit FB030 est un très fort producteur de TNF- α et d'IL-10 et un producteur moyen d'IL-6. Le produit 48h est un fort producteur d'IL-6 et un faible inducteur de TNF- α et d'IL-10. Lorsque les effets produits étaient comparés à ceux observés avec le lactosérum non-fermenté, les préparations solubles de MPM diminuaient la production de TNF- α induite par le lactosérum ou par les LPS et/ou le PEP suite à la sécrétion de d'IL-6, d'IL-10 et/ou de PGE2 (Beaulieu *et al.*, 2006; Lemieux *et al.*, 2004; Technologie BiolActis Inc., 2010).

D'autre part, l'augmentation accrue des TNF- α , IL-6, IL-10 et surtout de la PGE2 par le MPM 48h, et ne contenant pas la bactérie R2C2 (forme solide) suggère que la souche R2C2 de *L. kefiranofaciens* aurait plutôt un effet inhibiteur sur les propriétés immunomodulatrices des MPMs fermentés. Cette hypothèse doit être évaluée à la lumière des résultats obtenus avec un extrait soluble de la bactérie R2C2. Effectivement, cette souche est une bonne inductrice d'IL-10, mais une faible productrice d'IL-6, suggérant des propriétés immunosuppressives intrinsèques. Les bactéries lactiques sont généralement connues pour

leur activité immunostimulatrice plutôt qu'immunosuppressive, car elles augmentent la réponse proliférative des lymphocytes, la production des cytokines et la stimulation de la phagocytose via l'induction de cytokines résultant de l'interaction entre les macrophages et les lymphocytes T (Laffineur *et al.*, 1996). Nos travaux ne sont pas suffisamment avancés sur les propriétés immunomodulatrices de cette souche de lactobacilles pour confirmer les effets immunosuppresseurs potentiels de la souche R2C2, mais il est connu que certaines souches de lactobacilles, comme *L. acidophilus*, montrent aussi des propriétés immunosuppressives via la stimulation de l'IL-10 (Bleau *et al.*, 2007). D'autre part, il a déjà été démontré que les effets immunomodulateurs des préparations solubles de MPMs diffèrent lorsque les macrophages sont activés par le LPS ou le PEP. Les milieux conditionnés de macrophages activés et traités avec les produits de BiolActis ont plutôt entraîné soit une légère stimulation additionnelle des lymphocytes, telle qu'observée avec le PEP, ou soit aucune inhibition de la stimulation induite par le LPS (étude préalable) (Technologie BiolActis Inc., 2010). Ces résultats suggèrent que ces produits pourraient agir différemment selon l'état d'activation des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la production des cytokines.

L'étude des voies de signalisation impliquées dans l'induction du TNF- α , de l'IL-6, de l'IL-10 et de la PGE2 chez des macrophages de souris C57BL/6 activés par le PEP et traités avec les différents produits de BiolActis nous a révélé que les modifications dans les niveaux d'IL-6 et de PGE2 induites par les produits de BiolActis étaient régulées par les voies des MAPK p38 et ERK, par le NF- κ B et la COX-2 à l'exception du FB030-2 pour l'IL-6. L'augmentation d'IL-6 accompagnée d'une diminution de PGE2 s'est avérée être une caractéristique commune pour la plupart de produits de fermentation (sauf pour le produit obtenu après 16 h de fermentation). Ces résultats suggèrent le mécanisme d'action suivant : les produits solubles des MPMs de BiolActis stimuleraient la voie de la MAPK ERK, chez des macrophages déjà activés par le PEP via le TLR-2, activant préférentiellement le facteur NF- κ B responsable de l'augmentation de l'IL-6 et du TNF- α et ce, au dépend de la voie Cox-2, entraînant une diminution de la PGE2. Cette explication, par contre, ne tient pas compte des rôles de la voie MAPK p38 et du récepteur opioïde chez certains produits, ni de la baisse de l'IL-10. De plus, une activation préférentielle d'une voie de signalisation implique un ou des facteurs responsables de ce choix, ce que nos résultats ne peuvent encore

mettre en lumière. Il est alors possible qu'un arrêt de stimulation de la voie MAPK p38 entraînerait la diminution de l'IL-10, ce qui empêcherait l'inhibition de l'IL-6 et donc, indirectement, l'augmentation de cette dernière cytokine. Cette hypothèse est partiellement supportée par la baisse dans la production de l'IL-10, mais il faudrait que l'activation via les récepteurs aux cytokines ne soit plus requise et résulte d'une captation du TNF- α par son récepteur soluble. Il est, par contre, plus plausible que les produits de BiolActis engagent le récepteur opioïde qui peut agir directement comme inhibiteur de l'IL-10, puisque la diminution de cette cytokine est corrigée en présence d'un inhibiteur des récepteurs opioïdes (Sacerdote, 2003). Il a été récemment démontré que le PEP pouvait directement stimuler la production d'acide arachidonique et de la PGE2 par un mécanisme non-encore identifié mais suggérant l'existence d'un engagement non-classique du TLR-2 ou de la participation d'autres récepteurs, tels les récepteurs au mannose (Valera *et al.*, 2007). La diminution de la production de PGE2 par les produits de BiolActis pourrait aussi résulter de l'activation des récepteurs au mannose présents à la surface des macrophages suite à la fixation de fragments de paroi bactérienne. Il ne faut pas exclure la possibilité que la diminution de la PGE2 peut résulter directement de l'effet de la lactoferrine résiduelle suite à la fermentation, car cette protéine peut diminuer la production de PGE2 (Talukder *et al.*, 2007). D'autre part, l'augmentation de l'IL-6 et de l'IL-10 suite à l'action de la bactérie R2C2 dépend plutôt des MAPK p38 et ERK plutôt que de NF- κ B, tel que l'on aurait pu s'y attendre compte tenu de la présence de paroi bactérienne. L'augmentation forte de l'IL6 et de l'IL-10 suggère une voie de signalisation passant directement par la MAPK p38 et ERK1/2, mais le récepteur impliqué n'a pas été identifié. L'inhibition partielle ou nulle de la production de ces cytokines par l'inhibiteur de NF- κ B suggère aussi l'existence d'un autre facteur de transcription impliqué dans la transcription de ces cytokines, ou que les produits ajoutés, soit l'extrait soluble de la bactérie R2C2 ou des MPMs, entrent en compétition avec cet inhibiteur, réduisant ainsi l'inhibition de NF- κ B. Il aurait été intéressant d'essayer d'autres substances inhibitrices ou activatrices impliquant d'autres récepteurs et/ou voies métaboliques, par exemple inhiber/activer le récepteur au mannose ou les différents TLR (1-9). IL serait aussi favorable de vérifier l'implication de récepteurs membranaires plutôt que des voies métaboliques, car l'étude de celles-ci est beaucoup plus complexe étant donné que plusieurs substances dans les produits BiolActis peuvent les inhiber et/ou les stimuler en même temps et parce qu'elles sont

toutes inter-reliées à différents niveaux. Il demeure cependant très difficile d'isoler l'effet du PEP et des produits BiolActis d'autant plus que l'effet observé suggère parfois une synergie entre le PEP et le produit testé.

Des travaux similaires effectués avec des cellules de souris SJL, lignée fortement orientée vers la réponse inflammatoire de type Th1, ont montré que les produits de BiolActis induisaient des effets pro-inflammatoires faibles (augmentation de TNF- α et d'IL-6 avec diminution d'IL-10) et variant selon la concentration chez cette lignée murine (Beaulieu *et al.*, 2006; Technologie BiolActis Inc., 2010). Mais encore une fois, ce sont les MAPK p38 et ERK1/2 qui sont impliquées dans ces variations alors que le NF- κ B aurait une influence indirecte sur la production de l'IL-10.

La difficulté dans l'identification d'une voie de signalisation commune et spécifique pour expliquer les propriétés immunomodulatrices des MPMs est due à la composition complexe des préparations solubles qui peuvent contenir des quantités variables de plusieurs composants immunomodulateurs ou immunosuppresseurs différents en provenance du lactosérum, des bactéries, ou produits au cours du processus de fermentation. Il faudrait pouvoir réaliser les mêmes expériences avec chacun des constituants majeurs des dérivés de BiolActis suite à leur purification. D'autre part, les différences dans les niveaux de cytokines observées avec les produits de BiolActis suggèrent aussi que des modifications fines dans les processus de fabrication ou dans la composition des lots de lactosérum utilisés peuvent modifier substantiellement l'équilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et suppressives induites par le produit final. D'autre part, plusieurs TLR peuvent être impliqués, tel le TLR-2 avec le PEP dérivant du lactobacille et le TLR-9 dérivant de l'ADN bactérien suite à la phagocytose selon la composition du dérivé testé de telle sorte que les effets finaux résultent d'effets synergiques de la voie des TLR. Des expériences similaires réalisées avec des cellules de souris TLR2 $-/-$ ou TLR9 $-/-$ ou MyD88 $-/-$ permettraient de bien différencier les effets de chacun des dérivés sur ces différents TLR.

Les modifications dans la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires induites par les produits de BiolActis pourraient avoir des répercussions sur les pourcentages des

différentes populations lymphocytaires *in vitro* (résultats préliminaires) (Beaulieu *et al.*, 2006; Technologie BiolActis Inc., 2010). Ainsi, les lymphocytes B ont diminué suite à l'incubation de cellules spléniques avec des milieux de macrophages conditionnés par les différents produits de BiolActis. Cette diminution dans le pourcentage de lymphocytes B est surprenante compte tenu de l'augmentation de l'IL-6 induite par les produits de BiolActis, mais l'augmentation des lymphocytes B ne dépend pas seulement de cette cytokine (revue dans Chen-Kiang, 1995). Par contre, la baisse d'IL-10 pourrait favoriser plutôt la voie Th1 et maintenir ou augmenter les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺. La chute simultanée des CD4⁺ observée avec la plupart des extraits solubles des MPMs va à l'encontre de cette hypothèse. Il peut s'agir d'une chute apparente due à l'augmentation d'autres éléments cellulaires. Une baisse dans le pourcentage d'une population cellulaire associée à une augmentation d'activité métabolique, suggère non pas une diminution absolue de lymphocytes B, mais bien une augmentation dans le nombre de cellules d'une autre population cellulaire, ce qui pourrait être mis en évidence par l'analyse du nombre absolue de lymphocytes. Effectivement, l'analyse cytofluorométrique a mis en lumière l'augmentation d'une population cellulaire de plus grande dimension qui pourrait s'apparenter à des cellules NK. Cette hypothèse aurait intérêt à être approfondie en association avec la production de cytokines plus spécifiques pour ces cellules, tels les IL-12, 15 et 18.

Les propriétés immunomodulatrices des préparations solubles de BiolActis peuvent s'exprimer au niveau des cellules épithéliales intestinales. Les cellules intestinales épithéliales produisent de l'IL-8, une chimiokine impliquée dans le recrutement des neutrophiles, lorsqu'elles sont stimulées par l'IL-1 β . Comme les problèmes inflammatoires intestinaux débutent souvent par une atteinte aux tissus épithéliaux (Araki *et al.*, 2006), nous avons vérifié si les produits de BiolActis pouvaient aider à diminuer l'inflammation au niveau épithélial. L'utilisation des cellules intestinales Caco-2 suggèrent, malgré leur fragilité en culture, que tous les produits de BiolActis pourraient avoir la capacité de diminuer l'apoptose spontanée des cellules Caco-2. Le niveau élevé de nécrose et d'apoptose du contrôle cellulaire Caco-2 reflète les difficultés de croissance de cette lignée cellulaire. De plus, suite à l'activation de ces cellules par l'IL-1 β , tous les produits ont diminué la production d'IL-8 à des degrés variables selon le produit ou la concentration. Ces deux propriétés suggèrent que

les substances présentes dans les préparations solubles pourraient montrer un effet protecteur de l'épithélium intestinal et favoriser le maintien de la tolérance en diminuant le recrutement de neutrophiles (Williams *et al.*, 2000).

Les études *in vivo* ont été effectuées par l'utilisation du modèle de colite expérimentale aiguë induite par le DSS. Parmi les modèles expérimentaux de colite inflammatoire, le modèle DSS a été choisi de par les résultats antérieurs prometteurs obtenus par BiolActis mais aussi de par ses spécificités par rapport aux modèles de colite induite par le TNBS ou chez des souris IL-10 $-/-$. Le modèle DSS affecte tout l'intestin et peut se manifester sous forme aiguë et chronique alors que le modèle TNBS est valide pour une inflammation aiguë au niveau du colon terminal seulement, alors que le modèle des souris IL-10 $-/-$ ne peut être représentatif de colites cliniques chez l'humain qui n'a pas de déficit génétique en IL-10. Les maladies inflammatoires intestinales comprennent deux formes majeures : la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Ces maladies se distinguent par leurs signes cliniques et les types de lésions. De plus, ce sont des maladies à évolution chronique. Les études récentes ont montré que ces maladies résultent de plusieurs facteurs génétiques, microbiens et environnementaux qui s'associent à des aberrations fonctionnelles de l'intestin et entraînent des désordres immunitaires chroniques. Il s'agit de maladies à étiologies complexes. Le modèle de colite induite par le DSS permet de simuler autant l'inflammation aiguë que la maladie chronique dépendamment de la concentration utilisée et des cédules d'administration. De plus, ce produit est administré dans l'eau de boisson, ce qui le rend facile d'utilisation. Le DSS s'attaque au départ à l'épithélium intestinal et entraîne un bris de la barrière épithéliale mettant la flore microbienne en contact avec les cellules macrophagiques et dendritiques sous-jacentes (Ishioka *et al.*, 1987).

Le modèle de la colite inflammatoire induite par le DSS se caractérise par des modifications dans l'expression de plus de 387 gènes dans le tissu intestinal dont les principaux gènes impliqués dans l'équilibre tolérance/inflammation intestinale sont le TNF- α , l'IL-6, l'IL-10, l'IL-22 et la COX-2 mais non l'IFN- γ (te Velde *et al.*, 2006). Plusieurs chimiokines sont aussi impliquées ainsi que des gènes de réparation tissulaire. L'analyse des cytokines sécrétées révèle que la colite aiguë induite par le DSS entraîne un déplacement du

mécanisme inflammatoire des Th1 vers les Th17, ce qui s'exprime par l'augmentation du TNF- α , de l'IL-6, de l'IL-23 et de l'IL-17. Lorsque la colite évolue vers une inflammation chronique, il se produit une réponse inflammatoire de type Th2 caractérisée par une augmentation d'IL-4, d'IL-10 et une diminution du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-17 (Alex *et al.*, 2008). Ces caractéristiques rejoignent partiellement les modifications observées chez des patients atteints de la maladie de Crohn ou de la colite ulcéreuse mais pourrait refléter toute inflammation intestinale aigue d'étiologie toxique ou bactérienne reliée à la destruction de l'épithélium intestinal, ce qui représente bien la plupart des troubles gastro-intestinaux légers et aigus. Le modèle TNBS, quant à lui, en est un de réaction d'hypersensibilité hapténique qui favorise plutôt une réponse inflammatoire de type Th1 et Th17 (Alex *et al.*, 2008).

Nos résultats ont montré que l'administration d'une concentration légèrement plus faible de DSS que celle généralement utilisée dans la littérature pouvait induire une colite légère, caractérisée par une perte de poids et une inflammation non-hémorragique. Ainsi, lors de la première série d'expériences de colite induite par le DSS et de traitement simultané avec le MPM, les animaux ayant reçu du DSS durant 6 jours ont montré une perte de poids dans les premiers jours du traitement avec une correction temporaire suivie d'une seconde perte de poids qui s'est maintenue quelques jours après le traitement et rapidement compensé par la suite. Ces résultats suggèrent que la concentration de DSS utilisée était suffisamment faible pour entraîner des désordres intestinaux modérés. Le traitement de ces souris avec le MPM a clairement empêché ces pertes de poids même si les souris ont eu temporairement un peu de difficulté à maintenir leur taux de croissance après quelques jours. Cette correction de la perte de poids pourrait résulter de la diminution de la perte d'eau reliée à la diminution de la diarrhée et aussi par une alimentation accrue de la part de l'animal suite à une amélioration de sa sensation de bien-être. Par contre, l'ampleur de la correction de la perte de poids ne peut dépendre de l'apport nutritif du MPM étant donné la faible dose administrée. Lors de l'euthanasie, le traitement avec le MPM n'avait pas corrigé le niveau d'inflammation intestinale, du moins lorsque comparé aux côlons des animaux quatre jours après la cessation de l'administration du DSS. Il est possible que si l'euthanasie avait eu lieu dès la cessation du DSS, les différences auraient été plus évidentes. L'analyse des cytokines présentes dans le tissu intestinal lors de l'euthanasie montrait une légère baisse (quoique non significative à

cause de la forte variation individuelle) de $\text{TNF-}\alpha$ et d'IL-10 chez les animaux ayant reçu le MPM comme traitement de la colite au DSS, suggérant une tendance pour le MPM à diminuer le niveau d'inflammation. Le haut niveau de ces cytokines chez ces souris expliquent l'inflammation du côlon encore présente. Par contre, le niveau de PGE2 a été significativement diminué chez les animaux traités avec le MPM. Il a déjà été démontré que la lactoferrine pouvait protéger de la diarrhée induite par le LPS en diminuant la production de NO et de PGE2 (Talukder *et al.*, 2007). La lactoferrine est aussi connue pour augmenter l'activité des cellules NK et la production d'IFN- γ en réponse à l'IL-18, la cytokine inflammatoire la plus importante lors d'une inflammation de type Th1 (Kuhara *et al.*, 2006). Quoique l'IFN- γ et l'IL-18 n'ont pas été dosés dans le tissu intestinal, les cellules NK ont plutôt diminué suite au traitement par le MPM atteignant un niveau plus faible que celui observé chez les animaux non-traités, ce qui laisse croire que les niveaux d'IFN- γ et/ou d'IL-18 n'auraient possiblement que peu ou pas augmenté.

L'analyse des populations lymphocytaires des tissus intestinaux (lamina propria et épithélium) a révélé que le traitement par le MPM a favorisé l'augmentation des lymphocytes CD4+CD8+ mais surtout a corrigé la perte des lymphocytes $\text{CD4+TCR}\gamma\delta+$ intra-épithéliaux et de la lamina propria ainsi que celle des lymphocytes B de la lamina propria. Il faut tenir compte du fait que l'inflammation a pu entraîner des déplacements dans les populations lymphocytaires de la lamina propria vers le tissu épithélial et inversement, selon les populations lymphocytaires. La forte baisse des lymphocytes B observée dans la lamina propria des animaux soumis au DSS ne peut résulter d'un transfert de cellules puisqu'aucune augmentation n'est observée dans les lymphocytes intra-épithéliaux. Le maintien de la population de lymphocytes B dans la lamina propria grâce à l'administration de MPM a sûrement favorisé l'augmentation de ces lymphocytes dans le tissu épithélial. D'autre part, la stimulation des lymphocytes $\text{CD4+TCR}\gamma\delta+$ chez les souris traitées avec le MPM suggère que cette sous-population suppressive serait impliquée plutôt que les cellules suppressives Treg FoxP3 puisque leur pourcentage a diminué chez les animaux ayant reçu du DSS avec ou sans traitement avec le MPM. Aussi, le traitement avec le MPM a favorisé une augmentation des CD4 et des CD8 et corrigé la baisse des lymphocytes B dans les plaques de Peyer par rapport aux souris soumises seulement au DSS. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que

le MPM a eu un effet favorable sur la colite aigue lorsqu'administrés au début de la colite. Le mécanisme d'action ne semble pas en être un d'inhibition de l'inflammation, du moins, tel qu'observé suite à l'euthanasie quatre jours après l'arrêt du DSS, mais pourrait résulter d'un changement dans le type d'inflammation résultant de la diminution de la PGE2 et de la stimulation de lymphocytes TCR $\gamma\delta$ et/ou des lymphocytes B.

Nous avons aussi évalué les effets du MPM et de la bactérie R2C2, administrés seuls et séparément en prétraitement, à des souris soumises au DSS. Au contraire de ce qui avait été observé lors de l'administration simultanée de MPM, le prétraitement avec ce produit a entraîné une perte de poids aux 14^e et 15^e jours de l'expérience. Ce résultat surprenant peut être relié au fait que les souris ayant reçu le MPM ont montré un arrêt de gain de poids tout au long de l'expérience. Cette aggravation n'a pas été, par contre, accompagnée d'une baisse importante d'hématocrite comme ce qui s'est produit chez les souris soumises au DSS seulement. Cette aggravation de la perte de poids s'est aussi manifestée par une inflammation accrue de l'intestin ainsi que d'une forte production de TNF- α et d'IL-6 en absence d'IL-10. Cette diminution d'IL-10 est intéressante puisque le MPM semble être un bon inducteur d'IL-10 chez les souris traitées seulement avec ce produit. De plus, l'analyse des sous-populations de lymphocytes intestinaux a mis en évidence le fait que le MPM favorise l'augmentation de sous-populations de lymphocytes T connues comme suppressifs, les TCR $\gamma\delta$, mais en même temps augmente les lymphocytes B et une nouvelle population, les CD19(B)+NK1.1+ dont l'existence n'est pas encore reconnue. De plus, la sous-population de lymphocyte CD4+IL-17+ était particulièrement stimulée par le MPM. L'administration de DSS aux souris déjà traitées avec le MPM a eu comme effet d'augmenter la production de cytokines inflammatoires à des niveaux plus élevés que ceux induits par le DSS seul, suggérant un effet additif de l'inflammation induite par le DSS et de l'immunostimulation provoquée par le MPM. Cet effet additif a pu résulter de la baisse de l'IL-10 et des lymphocytes TCR $\gamma\delta$ induite par le DSS, mais aussi de la stimulation des lymphocytes inflammatoires CD4+IL-17+. L'importance de cette dernière sous-population dans l'aggravation de la perte de poids est confirmée par le fait que le MPM a stimulé fortement la production de l'IL-23 et en conséquence, de l'IL-17 alors que l'administration de DSS en présence de MPM ou de la bactérie R2C2 a diminué la production de ces cytokines. La voie d'activation de la

production de la cytokine IL-17 nécessite la production de l'IL-23 par des macrophages ou des cellules dendritiques. Plusieurs produits bactériens, tels le PEP, le LPS et les exopolysaccharides, sont de bons inducteurs de cette voie de réponse inflammatoire (Beaulieu *et al.*, 2007), mais aussi l'augmentation de la PGE2 au site d'inflammation stimule la voie IL-17-IL23 (Th17) (Sheibanie *et al.*, 2007). Les MPMs sont principalement composés de protéines et de polysaccharides et contiennent plus de 6×10^{11} CFU/100g (Beaulieu *et al.*, 2007) qui pourraient aisément agir comme inducteurs de l'IL-23. L'augmentation de la production de l'IL-23 par le MPM explique la forte production de l'IL-17 résultant de l'augmentation de la sous-population de lymphocytes CD4+IL-17+. De plus, des résultats récents montrent que la maladie de Crohn est régulée par l'IL-23 (Th17) plutôt que l'IL-12 et l'IFN- γ (Th1) (Neurath, 2007). Il a été démontré que l'inflammation chronique est favorisée par la voie IL-23-IL-17 plutôt que par la voie IL-12-Th1. Ainsi, dans la lamina propria, les macrophages sont les principaux producteurs d'IL-10 qui, avec le TGF- β , stimule la production de lymphocytes T régulateurs (FoxP3) (Denning *et al.*, 2007). Ce sont plutôt les cellules dendritiques qui induisent la production de l'IL-17 alors que les macrophages inhibent cette production.

Nos résultats suggèrent fortement que le MPM active l'inflammation via la stimulation de la voie Th17, ou induit une sur-stimulation de la voie Th2 associée à la colite causée par le DSS, plutôt que la voie Th1. La sur-stimulation de la voie Th2 pourrait aussi expliquer l'aggravation de certains paramètres. Il a été rapporté que l'orientation vers la voie Th17 plutôt que vers la voie Th1 peut entraîner une diminution de la colite expérimentale de par la diminution de l'IFN- γ (Neurath, 2007). Cette hypothèse expliquerait l'absence d'anémie chez les souris ayant reçu le MPM avant le DSS malgré la présence d'un certain niveau d'inflammation. Il est fort possible que si le traitement avec le MPM avait été continué sur une plus longue période, l'inflammation se serait possiblement résorbée ou se serait maintenue à un niveau un peu plus élevé favorisant ainsi une réponse humorale antimicrobienne plus efficace. Nous ne pouvons éliminer la possibilité que les produits résiduels du lactosérum dans le MPM, tel la lactoferrine, auraient pu entraîner une forte activité de recrutement de macrophages et de neutrophiles en plus de favoriser une réponse

de type Th1 (McKensie *et al.*, 2006), mais l'absence d'informations sur le niveau d'IFN- γ dans le tissu intestinal des animaux ne nous permet pas d'écarter cette hypothèse.

L'administration de la bactérie R2C2, quant à elle, n'a pas entraîné un arrêt du gain de poids des souris par rapport aux souris n'ayant reçu aucun traitement mais a aggravé encore plus fortement la perte de poids suite à l'administration de DSS. Quoique l'inflammation du côlon était très forte, chez les souris ayant reçu la bactérie R2C2 et traitées avec le DSS, mais similaire à celle observée chez les souris avec un prétraitement avec le MPM et ensuite avec le DSS, la nature des cytokines induites est fort différente. Le niveau de TNF- α chez ces souris R2C2-DSS est similaire à celui observé chez les souris R2C2 et est moins élevé que chez les souris DSS. La production d'IL-6 chez les souris R2C2-DSS est aussi similaire à celle détectée chez les souris DSS seulement, alors que l'IL-10 est augmentée que chez les souris R2C2-DSS. Ces résultats suggèrent que la forte inflammation observée chez les souris R2C2-DSS résulte d'autres cytokines que celles qui ont été analysées. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la bactérie R2C2 induit une forte production d'IL-23 et d'IL-17 sans causer une inflammation importante mais que, suite à l'administration du DSS, l'inflammation s'est aggravée et est accompagnée d'une chute importante de ces deux cytokines. Dans le modèle d'inflammation intestinale induite par le DSS, la phase aiguë se caractérise par des cytokines de type Th17 (TNF- α , IL-6, IL-17) alors que la phase chronique est plutôt de type pro-humorale avec des taux élevés d'IL-6, d'IL-4, d'IL-10 mais aussi d'IFN- γ (Alex *et al.*, 2008). Il est fort probable que l'administration préventive de la bactérie R2C2 ait favorisé plus rapidement la phase chronique de l'inflammation induite par le DSS et la production d'IFN- γ , car la baisse de poids s'est produite vers le 14^e et 15^e jour, donc après 7 à 8 jours d'administration de DSS. De plus, l'augmentation de l'IL-10 et le maintien d'un haut niveau d'IL-6 supporte cette hypothèse. Aussi, l'analyse des sous-populations lymphocytaires montre une augmentation des cellules NK suite à l'administration de la bactérie R2C2, qui sont des cellules productrices d'IFN- γ , mais en même temps le niveau de lymphocytes TCR $\gamma\delta$ est augmenté par la bactérie R2C2 et encore plus en présence de DSS. Les cellules NK ont aussi augmenté dans le tissu épithélial intestinal. La population CD4+IL-17+ est apparue dans les plaques de Peyer mais non pas dans la lamina propria et le tissu intraépithélial. De plus, l'administration de R2C2 a favorisé le développement de cellules

régulatrices FoxP3+ dans la lamina propria et le tissu épithélial, ce qui a été annihilé en présence de DSS accompagnée d'une diminution des lymphocytes B intraépithéliaux. Les modifications observées dans les sous-populations lymphocytaires intestinale lors de l'administration de R2C2 supportent plutôt une réponse de type Th1 que de type Th17 tout en favorisant une tolérance via les cellules T régulatrices FoxP3+ plutôt que par les TCR $\gamma\delta$. Il serait éventuellement intéressant de vérifier l'effet des produits BiolActis dans un modèle de colite induite au TNBS ou chez les souris knock-out pour l'IL-10.

Finalement, il est extrêmement intéressant de constater que le MPM généré par la fermentation du lactosérum par la bactérie R2C2 favoriserait une inflammation de type Th17, ce qui pourrait expliquer leur capacité à contrôler ou diminuer l'inflammation aigüe si cette dernière résulte de l'activation de la voie Th1. Par contre, la bactérie R2C2 semble plutôt induire une inflammation de type Th1, ce qui en fait un produit intéressant pour stimuler une réponse antimicrobienne plutôt qu'un produit anti-inflammatoire pour une pathologie chronique, sans exclure des bienfaits potentiels de la bactérie R2C2 dans certaines conditions chroniques nécessitant le retour transitoire à une phase aigüe afin d'éliminer efficacement l'agent causal. Il est aussi possible que l'administration de la bactérie R2C2 entraîne un bris de la tolérance intestinale en autant qu'elle soit vivante et qu'elle puisse coloniser significativement les tissus intestinaux.

CONCLUSION

Ce travail de recherche a permis d'établir des connaissances de base sur les effets anti-inflammatoires de différents produits de fermentation du lactosérum par des souches de *L. kefiranofaciens*. Les résultats ont aussi entrouvert plusieurs nouvelles pistes ou mécanismes qui vont permettre de mieux cibler les produits d'intérêts pour l'entreprise en fonction des conditions de préparations et de production ainsi qu'en fonction des applications potentielles de chacun des produits. Par contre, plusieurs des résultats obtenus ou des protocoles expérimentaux réalisés doivent être considérés comme des résultats préliminaires très prometteurs justifiant des études plus complètes et avec un plus grand nombre d'animaux.

Il est important de rappeler que les produits de fermentation du lactosérum montrent des propriétés stimulantes pour les lymphocytes suite à la production de cytokines macrophagiques pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Ainsi certains produits de fermentation diminuent la production de TNF- α induite par le lactosérum ou par le PEP par l'induction de l'IL-6, de l'IL-10 et/ou de la PGE2. Ces produits exercent leurs effets surtout par l'activation des voies dépendant des MAPK P38 et ERK1/2 ainsi que de la COX-2. La souche bactérienne R2C2 induit aussi bien la production d'IL-6 que celle de l'IL-10 chez les macrophages. Tous les produits de fermentation ont diminué la production de la chimiokine IL-8 par les cellules épithéliales intestinales impliquées dans l'induction de la réponse inflammatoire. Lors de la colite expérimentale induite par une dose modérée de DSS, l'administration simultanée de MPM a corrigé la perte de poids des animaux, réduit la production intestinale de TNF- α et rétablit la perte de lymphocytes B dans les tissus épithéliaux. L'utilisation préventive du MPM et de la bactérie R2C2 a empêché l'anémie induite par le DSS mais a aggravé la perte de poids et l'inflammation du côlon malgré la production accrue d'IL-10 et la stimulation de lymphocytes T suppresseurs. Ces effets sont accompagnés de l'activation d'une nouvelle classe de lymphocytes, les Th17.

Les résultats obtenus sont prometteurs car les différents produits de fermentation peuvent moduler les paramètres inflammatoires autant *in vivo* qu'*in vitro*. Les effets anti-

inflammatoires semblent plus intéressants lors d'une utilisation simultanée, suggérant la prise de ces produits lors de troubles gastro-intestinaux légers. D'autre part, des modifications fines dans les conditions de productions pourraient expliquer les différences observées dans l'efficacité anti-inflammatoire des produits.

En effet, la compagnie Technologie BiolActis Inc. développe maintenant le MPM-R14H00 dans leur programme gastro-intestinal pour contrôler l'inflammation intestinale. Le MPM-R14H00 possède un effet anti-inflammatoire dans les maladies gastro-intestinales comparable au 5-ASA dans un modèle de colite ulcéraire. Il a aussi été testé dans un modèle d'inflammation intestinale de colite causée par le DSS en évaluant la santé de l'animal au cours de la maladie par la mesure de la perte de poids, de la longueur du côlon ainsi que le score clinique de la maladie. Le MPM-R14H00 limite la perte de poids associée à la maladie intestinale et à la déshydratation, réduit les symptômes de l'inflammation gastro-intestinale telles que la diarrhée et la présence de sang dans les fèces, ralentit le processus de destruction de l'inflammation gastro-intestinal et aide à la rémission des animaux suite à une inflammation aigüe. La reconnaissance des motifs CpG bactériens et des PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) par le récepteur TLR9 semble mener à une augmentation de l'activité des cellules T régulatrices, qui contrôlent l'inflammation en exprimant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β , et par la production d'IFN- α par les cellules dendritiques. Ce produit est développé pour aider au contrôle des MII telles que la maladie de Crohn, la colite ulcéraire et les syndromes d'inflammation intestinale (Technologie BiolActis Inc., 2010).

Il est important de noter que nos expériences et recherches sur les différents produits BiolActis ont été faites avant les dernières découvertes de la compagnie Technologie BiolActis Inc, ce qui explique pourquoi nous avons testés des produits finalement non destinés au contrôle de l'inflammation intestinale dans un modèle d'inflammation intestinale. De plus, les expériences effectuées devaient répondre aux demandes directes et aux besoins de la compagnie. Donc, le choix des avenues à explorer, ainsi que le choix des expériences, dépendait des intérêts de Technologie BiolActis, selon leurs besoins et selon les autres expériences effectuées par leur groupe ou d'autres collaborateurs. Les résultats que nous

avons obtenus ont permis à la compagnie Technologie BiolActis Inc. de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'action de ses produits et de réorienter leur usage final. De plus, certains produits testés par notre équipe ont été abandonnés ou modifiés pour les besoins de la compagnie.

BIBLIOGRAPHIE

- Aggarwal BB, Puri RK. 1994. «Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy». B.B. Aggarwal, R.K. Puri, Editors. Boston, Blackwell.
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, De Sauvage FJ, Gurney AL. 2003. «Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17». *J. Biol. Chem.*, vol. 278, p. 1910-1921.
- Aggarwal S, Gurney AL. 2002. «IL-17: prototype member of an emerging cytokine family». *J. Leukoc. Biol.*, vol. 7, p. 1-11.
- Akira, S. 2006. «TLR signaling». *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol 311, p.1-6.
- Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X. 2009. «Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis». *Inflamm. Bowel. Dis.*, vol. 15, p. 341-352.
- Alvarez-Olmos MI, Oberhelman RA. 2001. «Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy». *Clin. Infect. Dis.*, vol. 32, p. 1567-1576.
- Andoh A, Hata K, Araki Y, Fujiyama Y, Bamba T. 2002. «Interleukin (IL)-4 and IL-17 synergistically stimulate IL-6 secretion in human colonic myofibroblasts». *Int. J. Mol. Med.*, vol. 10, p. 631-639.
- Andus T, Targan SR, Deem R, Toyoda H. 1993. «Measurement of tumor necrosis factor mRNA in small numbers of cells by quantitative polymerase chain reaction». *Reg. Immunol.*, vol. 5, p. 11-18.
- Araki Y, Sugihara H, Hattori T. 2006. «In vitro effects of dextran sulfate sodium on a Caco-2 cell line and plausible mechanisms for dextran sulfate sodium-induced colitis». *Oncol. Rep.*, vol. 16, p. 1357-1362.
- Arihara K, Toba T, Adachi S. 1990. «Immunofluorescence microscopic studies on distribution of *Lactobacillus kefiranoformis* and *Lactobacillus kefir* in kefir grains». *Int. J. Food. Microbiol.*, vol. 11, p. 127-134.
- Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. 2006. «Alterations in intestinal permeability». *Gut*, vol. 55, p. 1512-1520.
- Awane M, Andres PG, Li DJ, Reinecker HC. 1999. «NF-kappa Binding kinase is a common mediator of IL-17-, TNF-alpha-, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. » *J. Immunol.*, vol. 162, p. 5337-5349.

- Axelsson L-G. 1996. «Experimental animal models for the study of inflammatory bowel diseases and gastrointestinal anti-inflammatory drugs». *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the faculty of Science and Technology*, vol 215, p. 223-245.
- Axelsson L-G, Ahlstedt S. 1993. «Actions of sulphasalazine and analogues in animal models of experimental colitis». *Ammopharmacol.*, vol. 2, p. 219-232.
- Axelsson L-G, Landstroëm E, Goldschmidt TJ, Groënberg A, Bylund-Fellenius A-C. 1996. «Dextran sulphate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice. Effects in CD4+ cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice». *Inflammat. Res.*, vol. 45, p. 181-191.
- Axelsson L-G, Landstroëm E, Lundberg C, Bylund-Fellenius AC. 1996. «The degree of sulfate content and the molecular weight of dextran sulfate and carrageenan are important for the induction of colitis in mice». *Gastroenterol.*, vol. 110, p. 858-869.
- Axelsson L-G, Midtvedt T, Bylund-Fellenius A-C. 1996. «The role of intestinal bacteria, bacterial translocation and endotoxin in dextran sodium sulphate-induced colitis in the mouse. » *Microb. Ecol. Health. Dis.*, vol. 9, p. 225-237.
- Baumgart DC. 2009. «The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis». *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 106, p. 123-133.
- Baumgart DC, Carding SR. 2007. «Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology». *Lanc.*, vol. 369, p. 1627-1640.
- Beaulieu J, Dubuc R, Beaudet N, Dupont C, Lemieux P. 2007. «Immunomodulation by a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria». *J. Med. Food.*, vol. 10, p. 67-72.
- Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P. 2006. «Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health». *Therap.*, vol. 3, p. 69-78.
- Beaulieu J, Dupont C, Lemieux P. 2007. «Anti-inflammatory potential of a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria in an atopic dermatitis model». *J. Inflamm.*, vol. 21, p. 4-6.
- Beaulieu J, Girard D, Dupont C, Lemieux P. 2009. «Inhibition of neutrophil infiltration by a malleable protein matrix of lactic acid bacteria-fermented whey proteins in vivo». *Inflamm. Res.*, vol. 58, p. 133-138.
- Beagley KW, Fujihashi K, Lagoo AS, Lagoo-Deenadaylan S, Black CA, Murray AM. 1995. «Differences in intraepithelial lymphocyte T cell subsets isolated from murine small versus large intestine». *J. Immunol.*, vol. 154, p. 5611-5619.

- Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. 1995. «CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes». *Science*, vol. 268, p. 863-865.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M. 2006. «Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells». *Nature*, vol. 441, p. 235.
- Bjerknes M, Cheng H. 2005. «Gastrointestinal stem cells II. Intestinal stem cells». *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, vol. 289, p. G381-G387.
- Blaschitz C, Raffatellu M. 2010. «Th17 cytokines and the gut mucosal barrier». *J. Clin. Immunol.*, vol. 30, p. 196-203.
- Bleau C, Savard R, Lamontagne L. 2007. «Murine immunomodulation of IL-10 and IL-12 induced by new isolates from avian type 2 *Lactobacillus acidophilus*». *Can. J. Microbiol.*, vol. 53, p. 944-956.
- Braegger CP, Nicholis S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. 1992. «Tumor necrosis factor- α in stool as a marker of intestinal inflammation». *Lancet*, vol. 339, p. 89-101.
- Brandtzaeg P, Bjerke K, Kett K, Kvale D, Rognum TO, Scott H. 1987. «Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract». *Ann. Allergy.*, vol. 59, p. 21-39.
- Bylund-Fellenius AC, Landstroëm E, Axelsson LG, Midtvedt T. 1994. «Experimental colitis induced by dextran sulphate in normal and germfree mice». *Microb. Ecol. Health. Dis.*, vol. 7, p. 207-215.
- Calder PC. 2001. «Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity». *Lipids*, vol. 36, p. 1007-1023.
- Camoglio L, Juffermans NP, Peppelenbosch M, te Velde AA, ten Kate FJ, van Deventer SJ. 2002. «Contrasting roles of IL-12p40 and IL-12p35 in the development of hapten-induced colitis». *Eur. J. Immunol.*, vol. 32, p. 261-271.
- Carol M, Lambrechts A, Van Gossum A, Libin M, Goldman M, Mascart-Lemone F. 1998. «Spontaneous secretion of interferon gamma and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes». *Gut*, vol. 42, p. 643-649.
- Carvalho FA, Barnich N, Sauvanet P. 2008. «Crohn's disease-associated *Escherichia coli* LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin». *Inflamm. Bowel. Dis.*, vol. 14, p. 1051-1060.
- Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L. 1999. «Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium». *Arthritis. Rheum.*, vol. 42, p. 963-971.

- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS. 2002. «COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, p. 13926-13931.
- Chapat L, Chemin K, Dubois B, Bourdet-Sicard R, Kaiserlian D. 2004. «Lactobacillus casei reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation». *Eur. J. Immunol.*, vol. 34, p. 2520-2528.
- Chen BC, Liao CC, Hsu MJ, Liao YT, Lin CC, Sheu JR, Lin CH. 2006. «Peptidoglycan-induced IL-6 production in RAW 264.7 macrophages is mediated by cyclooxygenase-2, PGE2/PGE4 receptors, protein kinase A, I kappa B kinase, and NF-kappa». *B. J. Immunol.*, vol. 177, p. 681-693.
- Chen-Kiang S. 1995. «Regulation of terminal differentiation of human B-cells by IL-6». *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 194, p. 189-198.
- Chen Y, Conner EM, Grisham MB. 1995. «Dextran sulfate sodium (DSS)-induces colitis in rats by enhancing mucosal permeability: effects of sulfasalazine». *Gastroenterol.*, vol. 108, p. 796-809.
- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler D, Weiner HL. 1994. «Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis». *Science*, vol. 265, p. 1237-1244.
- Cheon H, Rho YH, Choi SJ, Lee YH, Song GG, Sohn J, Won NH, Ji JD. 2006. «Prostaglandin E2 augments IL-10 signaling and function». *J. Immunol.*, vol. 177, p. 1092-1099.
- Cheroutre H. 2005. «IELs: Enforcing law and order in the court of the intestinal epithelium». *Immunol. Rev.*, vol. 206, p. 114-131.
- Clancy R. 2003. «Immunobiotics and the probiotic evolution». *FEMS. Immunol. and Medic. Microbiol.*, vol. 38, p. 9-12.
- Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. 2004. «A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease». *Lab. Invest.*, vol. 84, p. 282-291.
- Cobb BA, Kasper DL. 2005. «Coming age: carbohydrates and immunity». *Eur. J. Immunol.*, vol. 35, p. 352-356.
- Colonna M. 2009. «Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity». *Immunity*, vol. 31, p. 15-23.
- Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J, Orme IM. 2002. «Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigenspecific cellular responses to

- mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present». *J. Immunol.*, vol. 168, p. 1322-1331.
- Cooper HS, Murthy SNS, Shah RS. 1993. «Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis». *Lab. Invest.*, vol. 69, p. 238-249.
- Cross ML, Mortensen RR, Kudsk J, Gill HS. 2002. «Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HNOO1 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice». *Med. Microbiol. Immunol.*, vol. 191, p. 49-53.
- Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V. 1996. «Increased interleukin-8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease». *Gut*, vol. 38, p. 216-222.
- Da Silva CA, Hartl D, Liu W, Lee CG, Elias JA. 2008. «TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation». *J. Immunol.*, vol. 181, p. 4279-4286.
- Deenick EK, Tangye SG. 2007. «Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation». *Immunol. Cell. Biol.*, vol. 85, p. 503-505.
- Deger C, Erbil Y, Giris M. 2006. «The effect of glutamine on pancreatic damage in TNBS-induced colitis». *Dig. Dis. Sci.*, vol. 51, p. 1841-1846.
- De la Rosa G, Yang D, Tewary P, Varadhachary A, Oppenheim JJ. 2008. «Lactoferrin acts as an alarm into promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses». *J. Immunol.*, vol. 180, p. 6868-6876.
- Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. 2007. «Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses». *Nat. Immunol.*, vol. 10, p. 1086-1094.
- De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo M.G, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Ysel H, de Vries J.E. 1991. «Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class II major histocompatibility complex expression». *J. Exp. Med.*, vol. 174, p. 915-922.
- De Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE. 1992. «Interleukin-10». *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 4, p. 314-320.
- Dey I, Lejeune M, Chadee K. 2006. «Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract». *Br. J. Pharmacol.*, vol. 149, p. 611-623.
- Dinarello, C.A. 1994. «The interleukin-1 family: 10 years of discovery». *FASEB J.*, vol. 8, p. 1314-1325.

- Ding L, Shevach EM. 1992. «IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function». *J. Immunol.*, vol. 148, p. 3133-3139.
- Eberl G. 2005. «Inducible lymphoid tissues in the adult gut: Recapitulation of a fetal developmental pathway» *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, p. 413-420.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. 2005. «Diversity of the human intestinal microbial flora». *Science*, vol. 308, p. 1635-1638.
- Eckert R, Randall D, Burggren W, French K. 1999. «Physiologie animale: Mécanismes et adaptations». De Boeck Université. New York.
- Elson CO, Sartor RB, Tennyson G, Riddel R. 1995. «Experimental models of IBD». *Gastroenterol.*, vol. 109, p. 1344-1367.
- Erickson KL, Hubbard NE. 2000. «Probiotic immunomodulation in health and disease». *J. Nutr.*, vol. 130, p. 403-409.
- FAO/WHO. 2002. «Guidelines for the evaluation of probiotics in food». Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. World Health Organization.
- Farnworth ER, Mainville I. 2003. «Kefir: a fermented milk product». Farnworth ER, editor. *Handbook of Fermented Functional Foods*. Florida. CRC Press. p. 77-112.
- Farstad IN, Halstensen TS, Fausa O, Brandtzaeg P. 1994. «Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches». *Immunology*, vol. 83, p. 457-464.
- Ferguson A. 1977. «Intraepithelial lymphocytes of the small intestine». *Gut*, vol. 18, p. 921-937.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. 1991. «IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages». *J. Immunol.*, vol. 147, p. 3815-3821.
- Fort M, Lesley R, Davidson N. 2001. «IL-4 exacerbates disease in a Th1 cell transfer model of colitis». *J. Immunol.*, vol. 166, p. 2793-2800.
- Frengova GI, Simova ED, Beshkova DM, Simov ZI. 2002. «Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains». *Z. Naturforsch.*, vol. 57, p. 805-810.
- Fujimoto M, Sato S. 2007. «B cell signaling and autoimmune diseases: CD19/CD22 loop as a B cell signaling device to regulate the balance of autoimmunity». *J. Dermatol. Sci.*, vol. 46, p. 1-9.

- Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y. 2003. «Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease». *Gut*, vol. 52, p. 65-75.
- Furukawa N, Matsuoka A, Yamanaka Y. 1991. «Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice». *J. Jpn. Soc. Nutr. Food. Sci.*, vol. 62, p. 579-585.
- Furukawa N, Matsuoka A, Takahashi T, Yamanaka Y. 2000. «Antimetastatic effect of kefir grain components on Lewis lung carcinoma and highly metastatic B16 melanoma in mice». *J. Agric. Sci. Tokyo. Nogyo. Daigaku.*, vol. 45, p. 6270.
- Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M. 1996. «Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5». *J. Immunol.*, vol. 157, p. 1261-1270.
- Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. 2003. «Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis». *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 15, p. 430-435.
- Geboes K, Desreumaux P, Fouret A, Ectors N, Rutgeerts P, Colombel JF. 1999. «Diagnostic histopathologiques de l'activité des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin». *Gastroenterol. Clin. Biol.*, vol. 23, p. 1062-1073.
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. «Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics». *J. Nutr.*, vol. 125, p. 1401-1412.
- Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. 2000. «NKT cells: facts, functions and fallacies». *Immunology Today*, vol. 21, p. 573-583.
- Gomi K, Zhu FG, Marshall JS. 2000. «Prostaglandin E2 selectively enhances the IgE-mediated production of IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by mast cells through an EP1/EP3-dependent mechanism». *J. Immunol.*, vol. 165, p. 6545-6552.
- Gonnella PA, Chen Y, Inobe J, Komagata Y, Quartulli M, Weiner HL. 1998. «In situ immune response in gut-associated lymphoid tissue (GALT) following oral antigen in TCR-transgenic mice». *J. Immunol.*, vol. 160, p. 4708-4718.
- Gor DO, Rose NR, Greenspan NS. 2003. «TH1-TH2: a procrustean paradigm». *Nat. Immunol.*, vol. 4, p. 503-505.
- Gosling JA. 2003. «Anatomie humaine: atlas en couleurs». 2^e édition. De Boeck Université. New York.

- Gray H. 1995. «Gray's anatomy: the anatomical basis of medicine and surgery». Llewellyn W. P. et Bannister L. H. Éditeurs. Elsevier. Churchill Livingstone, New York. 2092 p.
- Gross V, Andus T, Caesar I, Roth M, Scholmerich J. 1992. «Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease». *Gastroenterol.*, vol. 102, p. 514-521.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. 1997. «A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis». *Nature*, vol. 389, p. 737-742.
- Guarner F. 2006. «Prebiotics and mucosal barrier function». *J. Nutr.*, vol. 6(8), p. 2269-2280.
- Guilliano MJ, Foxx-Orenstein AE, Lebman DA. 2001. «The microenvironment of human Peyer's patches inhibits the increase in CD38 expression associated with the germinal center reaction». *J. Immunol.*, vol. 166, p. 2179-2185.
- Guy-Grand D, Vassalli P. 1993. «Gut intraepithelial T lymphocytes». *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 5, p. 247-252.
- Haller D, Serrant P, Peruisseau G, Bode C, Hammes WP, Schiffrin E, Blum S. 2002. «IL-10 producing CD14^{low} monocytes inhibit lymphocyte-dependent activation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria». *Microbiol. Immunol.*, vol. 46, p. 195-205.
- Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. 1974. «Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 71, p. 3824-3828.
- Hamilton SR. 1983. «Diagnosis and comparison of ulcerative colitis and Crohn's disease involving the colon». Pathology of the Colon, Small Intestine, and Anus. Norris HT éditeur. Churchill Livingstone, New York. p. 77-107.
- Hammes WP, Vogel RF. 1995. «The genus *Lactobacillus*». The lactic acid bacteria, vol. 2. The genera of lactic acid bacteria. B. J. B. Wood et W. H. Holzapfel éditeurs. Blackie Academic and Professional. London, United Kingdom. p. 19-54.
- Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. 2000. «Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods». *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 30, p. 61-67.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM. 2005. «Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages». *Nat. Immunol.*, vol. 6, p. 1123-1131.

- Hashimoto K, Durbin JE, Zhou W, Collins RD, Ho SB, Kolls JK, Dubin PJ, Sheller JR, Goleniewska K, O'Neal JF, Olson SJ, Mitchell D, Graham BS, Peebles RS Jr. 2005. «Respiratory syncytial virus infection in the absence of STAT 1 results in airway dysfunction, airway mucus, and augmented IL-17 levels». *J. Allergy. Clin. Immunol.*, vol. 116, p. 550-557.
- Hata K, Andoh A, Shimada M, Fujino S, Bamba S, Araki Y. 2002. «IL-17 stimulates inflammatory responses via NF-kappaB and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts». *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, vol. 282, p. 1035-1042.
- Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. 2001. «Intraepithelial lymphocytes: exploring the third way in immunology». *Nat. Immunol.*, vol. 2, p. 997-1003.
- Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L. 2003. «Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma». *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, vol. 28, p. 42-49.
- Hessle C, Andersson B, Wold AE. 2000. «Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production». *Infect. Immun.*, vol. 68, p. 3581-3586.
- Hessle C, Hanson LA, Wold AE. 1999. «Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production». *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 116, p. 276-282.
- Hinton JM. 1966. «Risk of malignant change in ulcerative colitis». *Gut*, vol. 7, p. 427-432.
- Hoffmann JC, Preiss JC, Autschbach F, Buhr HJ, Hauser W, Herrlinger K. 2008. « Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease». *Z. Gastroenterol.*, vol. 46, p. 1094-2046.
- Hoffmann JC, Zeitz M, Bischoff SC, Brambs HJ, Bruch HP, Buhr HJ. 2004. « Diagnosis and therapy of ulcerative colitis: results of an evidence based consensus conference by the German society of Digestive and Metabolic Diseases and the competence network on inflammatory bowel disease ». *Z. Gastroenterol.*, vol. 42, p. 979-983.
- Holtkamp W, Stollberg T, Reis HE. 1995. «Serum interleukin-6 is related to disease activity but not disease specificity in inflammatory bowel disease». *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 20, p. 123-131.
- Husband AJ, Bao S, Beagley KW. 1999. «Analysis of the mucosal microenvironment: factors determining successful responses to mucosal vaccines». *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 72, p. 135-142.

- Husband AJ, Beagley KW, McGhee JR. 1999. «Mucosal cytokines». *Mucosal Immunology*. Ogra PL, Lamm ME, Brenenstock J et McGhee JR éditeurs. Academic Press. New York, p. 541-557.
- Ihle JN. 1995. «Cytokine receptor signalling». *Nature*, vol. 377, p. 591-594.
- Ishioka T, Kuwabara N, Oohashi Y, Wakabayashi K. 1987. «Induction of colorectal tumors in rats by sulfated polysaccharides». *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 17, p. 215-244.
- Jay JM. 1996. «Modern food microbiology». 5^e éd. Chapman and Hall, New York. 661 p.
- Jewell DP, Chapman RGW, Mortensen N. 1992. «Ulcerative Colitis and Crohn's Disease, a Clinician's Guide». *London: Churchill Livingstone*. 79 p.
- Jin HZ, Fan XB, Hang XM, Li KB, Yang H. 2005. «Analysis of the probiotic Bifidobacterium and Lactobacillus community in child intestinal flora». *Wei Sheng Wu Xue Bao.*, vol. 45, p. 567-570.
- Kalka-Moll WM, Tzianabos AO, Bryant PW, Niemeyer M, Ploegh HL, Kasper DL. 2002. «Zwitterionic polysaccharides stimulate T cells by MHC class II-dependent interactions». *J. Immunol.*, vol.169, p. 6149-6153.
- Kato I, Endo-Tanaka K, Yokokura T. 1998. «Suppressive effects of the oral administration of Lactobacillus casei on type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice». *Life. Sci.*, vol. 63, p. 635-644.
- Kato I, Kobayashi S, Yokokura T, Mutai M. 1981. «Antitumor activity of Lactobacillus casei in mice». *Gann.*, vol. 72, p.517-523.
- Kato K, Mizuno S, Umesaki Y, Ishii Y, Sugitani M, Imaoka A, Otsuka M, Hasunuma O, Kurihara R, Iwasaki A. 2004. «Randomized placebo controlled trial assessing the effect of bifidobacteriafermented milk on active ulcerative colitis». *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 20, p. 1133-1141.
- Kimura I, Nagahama S, Kawasaki M, Kamiya A, Kataoka M. 1995. «Study on the experimental ulcerative colitis (UC) model induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats (II) ». *Folia.Pharmacol. Jpn.*, vol. 105, p. 145-152.
- Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. 1999. «Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS induced colitis». *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 61, p. 67-70.
- Kitazawa H, Harata T, Uemura J, Saito T, Kaneko T, Itoh T. 1998. «Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus». *Int. J. Food. Microbiol.*, vol. 40, p.169-175.

- Kitazawa H, Ishii Y, Uemura J, Kawai Y, Saito T, Kaneko T. 2000. «Augmentation of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*». *Food. Microbiol.*, vol. 17, p. 109-118.
- Kitazawa H, Itoh T, Tomioka Y, Mizugaki M, Yamaguchi T. 1999. «Induction of IFN and IL-1 production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris*». *Int. J. Food. Microbiol.*, vol. 31, p. 99-106.
- Kitazawa H, Watanabe H, Shimosato T, Kawai Y, Itoh T, Saito T. 2003. «Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6». *Int. J. Food. Microbiol.*, vol. 85, p. 11-21.
- Kitazawa H, Yamaguchi T, Fujimoto Y, Itoh T. 1993. «An analysis of mitogenic response of phosphopolysaccharide, a B-cell mitogen produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, to spleen cells». *Anim. Sci. Technol.*, vol. 64, p. 806-812.
- Kitazawa H, Yamaguchi T, Fujimoto Y, Itoh T. 1993. «Comparative activity of B-cell mitogen, a phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* on various lymphocytes». *Anim. Sci. Technol.*, vol. 64, p. 604-607.
- Kishimoto S, Kobayashi H, Shimizu S. 1992. «Changes of colonic vasoactive intestinal peptide and cholinergic activity in rats with chemical colitis». *Dig. Dis. Sci.*, vol. 37, p. 1729-1737.
- Klaenhammer TR, Altermann E, Pfeiler E, Buck BL, Goh YJ, O'Flaherty S, Barrangou R, Duong. 2008. «T Functional genomics of probiotic *Lactobacilli*». *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 42, p. 160-162.
- Kopp-Hoolohan L. 2001. «Prophylactic and therapeutics uses of probiotics: a review». *J. Am. Diet. Assoc.*, vol. 101, p. 229-238.
- Kucharzik T, Maaser C, Lügering A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S, Domschke W. 2006. «Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies». *Inflamm. Bowel. Dis.*, vol. 12, p. 1068-1083.
- Kuhara T, Yamauchi K, Tamura Y, Okamura H. 2006. «Oral administration of lactoferrin increases NK cell activity in mice via increased production of IL-18 and type I IFN in the small intestine». *J. Interferon. Cytokine. Res.*, vol. 26, p. 489-99.
- Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. 1993. «Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis». *Cell.*, vol. 75, p. 263-271.
- Kunisawa J, Kiyono H. 2005. «A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defence». *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, p. 1308-1321.

- Kusugami K, Fukatsu A, Tanimoto M, Shinoda M, Haruta J, Kuroiwa A, Ina K, Kanayama K, Ando T, Matsuura T, Yamaguchi T, Morise K, Jeda M, Iokawa H, Ishihara A, Sarai S. 1995. «Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent». *Dig. Dis. Sci.*, vol. 40, p. 949-959.
- Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC. 1999. «Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways». *J. Immunol.*, vol. 162, p. 2347.
- Laan M, Lotvall J, Chung KF, Linden A. 2001. «IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases». *Br. J. Pharmacol.*, vol. 133, p. 200-211.
- Laffineur E, Genetet N, Leonil J. 1996. «Immunomodulatory activity of beta-casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria». *J. Dairy. Sci.*, vol. 79, p. 2112-2120.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD. 2005. «IL-23 drives a pathogenic Tcell population that induces autoimmune inflammation». *J. Exp. Med.*, vol. 201, p. 233-239.
- Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal MR, Kastelein RA, Cua DJ. 2004. «IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity». *Immunol. Rev.*, vol. 202, p. 96-105.
- La Rivière JWM, Kooiman P, Schmidt K. 1967. «Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*». *Arch. Mikrobiol.*, vol. 59, p. 269-278.
- Lefrançois L, Lycke N. 1996. «Isolation of Mouse Small Intestinal Intraepithelial Lymphocytes, Peyer's Patch, and Lamina Propria Cells». *Curr. Protoc. Immunol.* vol. 3, p. 1-16.
- Lefrançois L, Puddington L. 2006. «Intestinal and pulmonary mucosal T cells: Local heroes fight to maintain the status quo». *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 24, p. 681-704.
- Lemieux P, Beaulieu J, Simard E. 2004. «Socioeconomic and health benefits of lactoceuticals». *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*, vol. 4, p. 199-206.
- Lesinski GB, Westerink MA. 2001. «Vaccines against polysaccharide antigens». *Curr. Drug. Targets. Infect. Disord.*, vol. 1, p. 325-334.
- Linden A. 2001. «Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma». *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, vol. 126, p. 179-188.

- Liu Y, Wang Y, Yamakuchi M, Isowaki S, Nagata E, Kanmura Y, Kitajima I, Maruyama I. 2001. «Upregulation of toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF-kappa b activation». *Infect. Immun.*, vol. 69, p. 2788-2796.
- Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H. 2002. «Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis». *Nat. Med.*, vol. 8, p. 500-512.
- Lubberts E. 2003. «The role of IL-17 and family members in the pathogenesis of arthritis». *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, vol. 4, p. 572-580.
- Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, Van Den BL, Coenen-De Roo CJ, Kolls JK. 2001. «IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis». *J. Immunol.*, vol. 167, p. 1004-1012.
- Maassen CB, van Holten-Neelen C, Balk F, den Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJ, Claassen E. 2000. «Strain-independent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains». *Vaccine*, vol. 18, p. 2613-2623.
- MacDonald TT, Di Sabatino A, Gordon JN. 2005. «Immunopathogenesis of Crohn's disease». *JPEN*, vol. 29, p. 118-124.
- Madsen K, Cornish A, Soper P. 2001. «Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function». *Gastroenterology*, vol. 121, p. 580-591.
- Maeda H, Zhu X, Omura K, Suzuki S, Kitamura S. 2004. «Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation». *Biofactors*, vol. 22, p. 197-200.
- Maeda H, Zhu X, Suzuki S, Suzuki K, Kitamura S. 2004. «Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B(T)». *J. Agric. Food. Chem.*, vol. 52, p. 5533-5538.
- Maeda M, Watanabe N, Neda H, Yamauchi N, Okamoto T, Sasaki H, Tsuji Y, Akiyama S, Tsuji N, Nitsu Y. 1992. «Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease». *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, vol. 14, p. 451-460.
- Mahida YR. 2000. «The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease». *Inflamm. Bowel. Dis.*, vol. 6, p. 21-33.
- Mahida YR. 2004. «Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses». *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 18, p. 241-253.

- Mahida YR, Ceska M, Effenberger F, Kurlak L, Lindley I, Hawkey CJ. 1992. «Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis». *Clin. Sci.*, vol. 82, p. 273-275.
- Mahida YR, Cunliffe RN. 2004. «Defensins and mucosal protection». *Novartis. Found. Symp.*, vol. 263, p. 71-77.
- Mahida YR, Kurlac L, Gallagher A, Hawkey CJ. 1991. «High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis». *Gut.*, vol. 32, p. 1531-1538.
- Mahida YR, Perkins AC, Frier M, Wastie ML, Hawkey CJ. 1992. «Monoclonal antigranulocyte antibody imaging in inflammatory bowel disease: a preliminary report». *Nucl. Med. Commun.*, vol. 13, p. 330-335.
- Mahida YR, Rolfe VE. 2004. «Host-bacterial interactions in inflammatory bowel disease». *Clin. Sci.*, vol. 107, p. 331-341.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO. 2006. «Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage». *Nature*, vol. 441, p. 231-239.
- Masopust D, Jiang J, Shen H, Lefrancois L. 2001. «Direct analysis of the dynamics of the intestinal mucosa CD8 T cell response to systemic virus infection». *J. Immunol.*, vol. 166, p. 2348-2356.
- Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H. 1999. «Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis». *Mult. Scler.*, vol. 5, p. 101-104.
- Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, Wagner H, Hess M, Laissue JA, Mueller C. 1994. «Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation». *Am. J. Pathol.*, vol. 144, p. 997-1009.
- McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. 2006. «Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway». *Trends. Immunol.*, vol. 27, p. 17-23.
- Melamed D, Friedman A. 1993. «Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin». *Eur. J. Immunol.*, vol. 23, p. 935-942.
- Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL. 1992. «Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 89, p. 421-425.

- Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O, Tanikawa K. 1994. «IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease». *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 96, p. 432-441.
- Miyara M, Sakaguchi S. 2007. «Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression». *Trends Mol. Med.*, vol. 13, p. 108-116.
- Mizoguchi A, Mizoguchi E. 2008. «Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models». *J. Gastroenterol.*, vol. 43, p. 1-17.
- Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N. 2001. «IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines». *J. Allergy. Clin. Immunol.*, vol. 108, p. 430-440.
- Morson BC. 1988. «Large intestine». *Colour Atlas of Gastrointestinal Pathology. Oxford University Press*, p. 190-205.
- Mosmann TR. 1991. «Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets». *Immunol. Res.*, vol. 10, p. 183-191.
- Mosmann TR. 1994. «Properties and functions of interleukin-10». *Adv. Immunol.*, vol. 56, p. 1-26.
- Mosmann TR, Moore KW. 1991. «The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses». *Immunol. Today*, vol. 12, p. 49-53.
- Mowat AM. 2003. «Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens». *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, p. 331-341.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. 2003. «Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation». *J. Exp. Med.*, vol. 198, p. 1951-1957.
- Murthy SNS, Cooper HS, Shim H, Shah RS, Ibrahim SA, Sedergran DJ. 1993. «Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin». *Dig. Dis. Sci.*, vol. 38, p. 1722-1734.
- Murthy SNS, Fondacaro JD, Murthy NS, Cooper HS, Bolkenius F. 1994. «Beneficial effects of MDL73404 in dextran sulfate-mediated murine colitis». *Agents Actions*, vol. 41, p. 233-234.
- Murakami M, Kudo I. 2002. «Phospholipase A2». *J. Biochem.*, vol. 131, p. 285-292.
- Murakami M, Nakatani Y, Atsumi G, Inoue K, Kudo I. 1997. «Regulatory functions of phospholipase A2». *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 17, p. 225-234.

- Murata Y, Ishiguro Y, Itoh J, Munakata A, Yoshida Y. 1995. «The role of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis». *J. Gastroenterol.*, vol. 30, p. 56-64.
- Murofushi M, Mizuguchi J, Aibara K, Matuhasi T. 1986. «Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice». *Immunopharmacology.*, vol. 12, p. 29-35.
- Nagler-Anderson C. 2000. «Tolerance and immunity in the intestinal immune system». *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 20, p. 103-120.
- Nair P, O'Donnell CM, Janasek K, Sajduk MK, Smith EA, Golden JM, Vasta CA, Huggins AB, Kurt RA. 2009. «Lipopolysacchride-treated mammary carcinomas secrete proinflammatory chemokines and exhibit reduced growth rates in vivo, but not in vitro». *Immunol. Invest.*, vol. 38, p. 730-748.
- Nair S, Ramaswamy PA, Ghosh S, Joshi DC, Pathak N, Siddiqui I, Sharma P, Hasnain SE, Mande SC, Mukhopadhyay S. 2009. «The PPE18 of Mycobacterium tuberculosis interacts with TLR2 and activates IL-10 induction in macrophage». *J. Immunol.*, vol. 183, p. 6269-6281.
- Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I. 2002. «Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17- deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses». *Immunity.*, vol. 17, p. 375-388.
- Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. 2003. «Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice». *J. Immunol.*, vol. 171, p. 6173-6177.
- Narumiya S. 1994. «Prostanoid receptors. Structure, function and distribution». *Ann N Y Acad. Sci.*, vol. 744, p. 126-138.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. 1999. « Prostanoid receptors: structures, properties and functions». *Physiol. Rev.*, vol. 79, p. 1193-1226.
- Neurath MF. 2007. «IL-23: a master regulator in Crohn disease». *Nat. Med.*, vol. 13, p. 26-28.
- Newberry RD, Lorenz RG. 2005. «Organizing a mucosal defense». *Immunol. Rev.*, vol. 206, p. 6-21.
- Nielsen OH, Brynskov J, Vainer B. 1996. «Increased mucosal concentrations of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), sE-selectin, and interleukin-8 in active ulcerative colitis». *Dig. Dis. Sci.*, vol. 41, p. 1780-1791.

- Nielsen OH, Kirman I, Rudiger N, Hendel J, Vainer B. 2003. «Upregulation of interleukin-12 and-17 in active inflammatory bowel disease». *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 38, p. 180-192.
- Nishimura-Uemura J, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T, Oda M, Saito T. 2003. «Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1». *Food. Microbiol.*, vol. 20, p. 267-273.
- Ohkusa T. 1985. «Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and a change of intestinal microflora». *Jpn. J. Gastroenterol.*, vol. 82, p. 1327-1336.
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. 1990. «A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice». *Gastroenterol.*, vol. 98, p. 694-702.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B. 2000. «Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12». *Immunity*, vol. 13, p. 715-723.
- O'Shea JJ, Murray PJ. 2008. «Cytokine signalling modules in inflammatory responses». *Immunity*, vol. 28, p. 477-487.
- Ouwehand A C, Salminen S, Isolauri E. 2002. «Probiotics: an overview of beneficial effects». *Anton. Van. Leeuwenhoek.*, vol. 82, p. 279-289.
- Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J. 2002. «A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit IL-23R». *J. Immunol.*, vol. 168, p. 5699-5709.
- Parhar K, Ray A, Steinbrecher U, Nelson C, Salh B. 2003. «The p38 mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-1 β -induced IL-8 expression via an effect on the IL-8 promoter in intestinal epithelial cells». *Immunology*, vol. 108, p. 502-512.
- Parry SL, Sebbag M, Feldmann M, Brennan FM. 1997. «Contact with T cells modulates monocyte IL-10 production: role of T cell membrane TNF- α ». *J. Immunol.*, vol. 158, p. 3673-3681.
- Pennington DJ, Silva-Santos B, Shires J, Theodoridis E, Pollitt C, Wise EL. 2003. «The inter-relatedness and interdependence of mouse T cell receptor gamma delta $^{+}$ and alpha beta $^{+}$ cells». *Nat. Immunol.*, vol. 4, p. 991-998.
- Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbato N. 1995. «Immune system stimulation by probiotics». *J. Dairy. Sci.*, vol. 78, p. 1597-1606.

- Pestka JJ, Ha CL, Warner RW, Lee JH, Ustunol Z. J. 2001. «Effects of ingestion of yogurts containing *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* on spleen and Peyer's patch lymphocyte populations in the mouse». *J. Food. Prot.*, vol. 64, p. 392-395.
- Pickard K, Bremmer AR, Gordon JN, MacDonald TT. 2004. «Microbiobial-gut interactions in health and diseases». Immune response. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 18, p. 271-285.
- Pinto D, Clevers H. 2005. «Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium». *Exp. Cell. Res.*, vol. 306, p. 357-363.
- Pizarro TT, Cominelli F. 2007. «Cytokine therapy for Crohn's disease: advances in translational research». *Annu. Rev. Med.*, vol. 58, p. 433-444.
- Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. 1994. «Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells». *Immunity*, vol. 1, p. 553-562.
- Price AB. 1992. «The pathology; Ulcerative colitis». *Inflammatory Bowel Disease*. Jaernerot G, Lennard-Jones JE, et Truelove S éditeurs. Malmoe, Sweden. p. 269-279.
- Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. 2008. «The bowel: A key component of the immune system». *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, vol. 100, p. 29-34.
- Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. 2003. «Potential uses of probiotics in clinical practice». *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 16, p. 658-672.
- Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. 1996. «Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease». *J. Clin. Immunol.*, vol. 16, p. 144-155.
- Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, Raedler A. 1993. «Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease». *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 94, p. 174-187.
- Rodrigues KL, Caputo LR, Carvalho JC, Evangelista J, Schneedorf JM. 2005. «Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract». *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 25, p. 404-408.
- Rogler G, Andus T. 1998. «Cytokines in inflammatory bowel disease». *World J. Surg.*, vol. 22, p. 382-389.
- Rogler G, Daig R, Vogl D, Gross V, Schoelmerich J, Andus T. 1997. «Intestinal epithelial cells secrete an antiinflammatory cytokine profile in culture». *Gastroenterology*, vol. 112, p. 1077-1089.

- Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P. 1993. «CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene». *J. Immunol.*, vol. 150, p. 5445-5456.
- Sacerdote P. 2003. «Effects of *in vitro* and *in vivo* opioids on the production of IL-12 and IL-10 by murine macrophages». *Ann N.Y. Acad. Sci.*, vol. 992, p. 129-140.
- Sacerdote P, Limiroli E, Gaspani L. 2003. «Experimental evidence for immunomodulatory effects of opioids». *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 521, p. 106-116.
- Sanos SL, Diefenbach A. 2010. «Isolation of NK cells and NK-like cells from the intestinal lamina propria». *Methods Mol. Biol.*, vol. 612, p. 505-517.
- Santos A, San Mauro M, Sanchez A, Torres JM, Marquina D. 2003. «The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir». *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 26, p. 434-437.
- Sartor RB. 1994. «Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiologic and clinical considerations». *Gastroenterol.*, vol. 106, p. 533-541.
- Satokari RM, Vaughan EE, Smidt H, Saarela M, Matto J, de Vos WM. 2003. «Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract». *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 26, p. 572-584.
- Schatzmann Peron JP, Ligeiro de Oliveira AP, Rizzo LV. 2009. «It takes guts for tolerance: The phenomenon of oral tolerance and the regulation of autoimmune response». *Autoimmun. Reviews*, vol. 9, p. 1-4.
- Schreiber S, Heinig T, Thiele H-G, Raedler A. 1995. «Immunoregulatory role of interleukin-10 in patients with inflammatory bowel disease». *Gastroenterol.*, vol. 108, p. 1434-1442.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. 1999. «Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2». *J. Biol. Chem.*, vol. 274, p. 17406-17409.
- Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z. 2000. «Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis». *J. Immunol.*, vol. 164, p. 4783-4794.
- Shanahan F. 1994. «The intestinal immune system. ». Physiology of the gastrointestinal tract. Johnson LR editor. *N.Y. Raven Press*, p. 643-684.
- Shaoul R, Okada Y, Cutz E, Marcon MA. 2004. «Colonic expression of MUC2, MUC5AC, and TFF1 in inflammatory bowel disease in children». *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 38, p. 488-493.

- Sheibanie AF, Yen JH, Khayrullina T, Emig F, Zhang M, Tuma R, Ganea D. 2007. «The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis». *J. Immunol.*, vol. 178, p. 8138-8147.
- Sher ME, D'Angelo AJ, Stein TA, Bailey B, Burns G, Wise L. 1995. «Cytokines in Crohn's colitis». *Am. J. Surg.*, vol. 169, p. 133-145.
- Shiomi M, Sasaki K, Murofushi M, Aibara K. 1982. «Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain». *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, vol. 35, p. 75-80.
- Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR. 2005. «Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology». *Can. J. Gastroenterol.*, vol. 19, p. 5-36.
- Smith WL, Garavito M, Dewitt D. 1996. «Prostaglandin endoperoxide H synthase (cyclooxygenases) -1 and -2». *J. Biol. Chem.*, vol. 271, p. 33157-33160.
- Smith WL, Meade EA, Dewitt DL. 1994. «Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozyme 1 and 2». *Ann N.Y. Acad. Sci.*, vol. 714, p. 136-142.
- Spahn TW, Kucharzik T. 2004. «Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. Recent advances in basic science». *Gut.*, vol. 53, p. 456-465.
- Spencer J, Isaacson PG, MacDonald TT, Thomas AJ, Walker-Smith JA. 1991. «Gamma/delta T cells and the diagnosis of coeliac disease». *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 85, p. 109-113.
- Spriggs MK. 1997. «Interleukin-17 and its receptor». *J. Clin. Immunol.*, vol. 17, p. 366-375.
- Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K. 2006. «European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis». *Gut*, vol. 55, p.1-15.
- Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. 2000. «Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10». *Science*, vol. 289, p. 1352-1355.
- Strader AD, Woods SC. 2005. «Gastrointestinal hormones and food intake». *Gastroenterol.*, vol. 128, p. 175-191.
- Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. 2002. «The immunology of mucosal models of inflammation». *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 20, p. 495-549.

- Strober W, Fuss I, Mannon P. 2007. «The fundamental basis of inflammatory bowel disease». *J. Clin. Invest.*, vol. 117, p. 514-521.
- Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. 2006. «A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis». *J. Exp. Med.*, vol. 203, p. 1685-1691.
- Takizawa H, Shintani N, Natsui M. 1995. «Activated immunocompetent cells in rat colitis mucosa induced by dextran sulfate sodium and not complete but partial suppression of colitis by FK506». *Digest.*, vol. 56, p. 259-264.
- Talukder MJ, Harada E. 2007. «Bovine lactoferrin protects lipopolysaccharide-induced diarrhea modulating nitric oxide and prostaglandin E2 in mice». *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 85, p. 200-208.
- Tannock GW. 2004. «A special fondness for lactobacilli». *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, p. 3189-3194.
- Technologie BioActis Inc. 2010. «Multi Plex Matrices action mechanisms». Laval, Qc, Canada. 18 p.
- Technologie BioActis Inc. 2010. «Products pipeline». Public company report. Laval, Qc, Canada. 27 p.
- Tejada-Simon MV, Lee JH, Ustunol Z, Pestka JJ. 1999. «Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice». *J. Dairy Sci.*, vol. 82, p. 649-660.
- Tejada-Simon M, Ustunol Z, Pestka JJ. 1999. «Ex vivo effects of lactobacilli, streptococci, and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model». *J. Food Protec.*, vol. 62, p. 162-169.
- Te Velde AA, de Kort F, Sterrenburg E, Pronk I, ten Kate FJ, Hommes DW, van Deventer SJ. 2007. «Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease». *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 13, p. 325-330.
- Te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. 2006. «Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis». *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 12, p. 995-999.
- Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, Devilder MC, Allain-Maillet S, Fournie JJ. 2007. «Self/non-self discrimination by human gamma delta T cells: simple solutions for a complex issue?» *Immunol. Rev.*, vol. 215, p. 123-135.
- Tilg H, Moschen AR. 2006. «Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity». *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, p. 772-783.

- Toba T, Abe S, Arihara K, Adachi S. 1986. «A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains». *Agric. Biol. Chem.*, vol. 50, p. 2673-2674.
- Toshiyuki M, Tsuneyoshi Y, Toshihiro S, Kenshi Y, Fumihito H, Hiroaki M, Sumio T, Yoko W, Akinori I, Sino K. 2003. «Clinical features and pattern of indeterminate colitis: Crohn's disease with ulcerative colitis-like clinical presentation». *J. Gastroenterol.*, vol. 38, p. 647-655.
- Tsukada Y, Nakamura T, Iimura M. 2002. «Cytokine profile in colonic mucosa of ulcerative colitis correlates with disease activity and response to granulocytapheresis». *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 97, p. 2820-2828.
- Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A. 2006. «Characterization of Foxp3 + CD4 + CD25+ and IL-10-secreting CD4 + CD25+ T cells during cure of colitis». *J. Immunol.*, vol. 177, p. 5852-5860.
- Valera I, Vigo AG, Alonso S, Barbolla L, Crespo MS, Fernández N. 2007. «Peptidoglycan and mannose-based molecular patterns trigger the arachidonic acid cascade in human polymorphonuclear leukocytes». *J. Leukoc. Biol.*, vol. 81, p. 925-933.
- Van Gossum A. 2007. «Probiotics and Inflammatory Bowel Diseases (IBD)». *Nutrit. Clin. et métabol.*, vol. 21, p. 81-84.
- Van Wijk F, Cheroutre H. 2009. «Intestinal T cells: Facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity». *Seminars in Immunology*, vol. 21, p. 130-138.
- Vinderola G, Duarte J, Thangavel D, Perdigo'n G, Farnworth E, Matar C. 2005. «Immunomodulating capacity of kefir». *J. Dairy Res.*, vol. 72, p. 195-202.
- Vinderola G, Duarte J, Thangavel D, Perdigo'n G, Farnworth E, Matar C. 2005. «Remote-site stimulation and duration of the immune response by kefir». *Eur. J. Inflamm.*, vol. 3, p. 63-73.
- Vinderola G, Matar C, Perdigon G. 2005. «Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors». *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 12, p. 1075-1084.
- Vinderola G, Perdigon G, Duarte J, Farnworth E, Matar C. 2006. «Effects of kefir fractions on innate immunity». *Immunobiology*, vol. 211, p. 149-156.
- Vinderola G, Perdigon G, Duarte J, Farnworth E, Matar C. 2006. «Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* on the gut mucosal immunity». *Cytokines*, vol. 36, p. 254-260.

- Vinderola G, Perdigon G, Duarte J, Farnworth E, Matar C. 2006. «Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation». *J. Dairy Res.*, vol. 73, p. 472-479.
- Watson AJ, Chu S, Sieck L, Gerasimenko O, Bullen T, Campbell F, McKenna M, Rose T, Montrose MH. 2005. «Epithelial barrier function in vivo is sustained despite gaps in epithelial layers». *Gastroenterology*, vol. 129, p. 902-912.
- Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM, Lefebvre C, Rioux JD, Mulder F, van Dullemen HM, Kleibeuker JH, Wijmenga C, Dijkstra G. 2008. «ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands». *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 103, p. 621-627.
- Weglarz L, Wawszczyk J, Orchel A, Jaworska-Kik M, Dzierzewicz Z. 2006. «Phytic Acid Modulates In Vitro IL-8 and IL-6 Release from Colonic Epithelial Cells Stimulated with LPS and IL-1 β ». *Br. J. Pharmacol.*, vol. 149, p. 611-623.
- Wehkamp J, Fellermann K, Stange EF. 2005. «Human defensins in Crohn's disease». *Chem. Immunol. Allergy*, vol. 86, p. 42-54.
- Weid von der T, Bulliard C, Schifffrin EJ. 2001. «Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4(+) T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor beta and interleukin-10». *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 8, p. 695-701.
- Weiner HL, Gonnella PA, Slavin A, Maron R. 1997. «Oral tolerance: cytokine milieu in the gut and modulation of tolerance by cytokines». *Res. Immunol.*, vol. 148, p. 528-533.
- Welman AD, Maddox IS. 2003. «Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges». *Trends Biotechnol.*, vol. 21, p. 269-274.
- Whitacre CC, Gienapp IE, Orosz CG, Bitar D. 1991. «Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for clonal anergy». *J. Immunol.*, vol. 147, p. 2155-2169.
- Willers J, Weiler E, Kolb C. 1995. «Stimulation of the same B-cell population by thymus-independent dextran and thymus-dependent oligosaccharide-carrier». *Scand. J. Immunol.*, vol. 42, p. 345-352.
- Williams EJ, Haque S, Banks C, Johnson P, Sarsfield P, Sheron N. 2000. «Distribution of the interleukin-8 receptors, CXCR1 and CXCR2, in inflamed gut tissue». *J. Pathol.*, vol. 192, p. 533-539.
- Williams JA, Pontzer CH, Shacter E. 2000. «Regulation of macrophage interleukin-6 (IL-6) and IL-10 expression by prostaglandin E2: the role of p38 mitogen-activated protein kinase». *J. Interferon Cytokine Res.*, vol. 20, p. 291-298.

- Wirtz S, Neufert C, Weigmann B. 2007. «Chemically induced mouse models of intestinal inflammation». *Nat. Protoc.*, vol. 2, p. 541-546.
- Xavier RJ, Podolsky DK. 2007. «Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease». *Nature*, vol. 448, p. 427-434.
- Yacyshyn BR, Pilarski LM. 1993. «Expression of CD45RO on circulating CD19+ B-cells in Crohn's disease». *Gut*, vol. 34, p. 1698-1704.
- Yamada M, Ohkusa T, Okayasu I. 1992. «Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium». *Gut*, vol. 33, p. 1521-1527.
- Yantiss RK, Odze RD. 2006. «Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology». *Histopathol.*, vol. 48, p. 116-132.
- Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau A-M, Painter SL, Comeau MR. 1995. «Herpesvirus saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to novel cytokine receptor». *Immunity*, vol. 3, p. 811-823.
- Ye P, Garvey PB, Zhang P, Nelson S, Bagby G, Summer WR. 2001. «Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection». *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, vol. 25, p. 335-348.
- Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P. 2001. «Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense». *J. Exp. Med.*, vol. 194, p. 519-531.
- Yen D, Cheung J, Scheerens H. 2006. «IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6». *J. Clin. Invest.*, vol. 116, p. 1310-1316.
- Youngman KR, Simon PL, West GA, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, Fiocchi C. 1993. «Localization of intestinal interleukin-1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells». *Gastroenterology*, vol. 104, p. 749-761.
- Zhang Z, Andoh A, Inatomi O, Bamba S, Takayanagi A, Shimizu N. 2005. «Interleukin-17 and lipopolysaccharides synergistically induce cyclooxygenase-2 expression in human intestinal myofibroblasts». *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 20, p. 619-632.
- Zhang Z, Oliver P, Schwarzenberger P, Kolls JK. 2006. «A critical role of Interleukin-17 in TNBS-induced Colitis». *Inflamm. Bowel. Dis.*, vol. 12, p. 382-388.